

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE OPTICA Y OPTOMETRÍA



TESIS DOCTORAL

Estudio con microscopía confocal del efecto sobre la densidad queratocitaria de la realización de "lasik" (laser in situ queratomileusis) con microqueratomo mecánico y con láser de femtosegundo

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Pilar Cañadas Suárez

Directores

Miguel Angel. Teus Guezala
José Luis Hernández Verdejo
Laura de Benito Llopis

Madrid, 2014

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Óptica y Optometría



**ESTUDIO CON MICROSCOPIA CONFOCAL DEL EFECTO SOBRE LA
DENSIDAD QUERATOCITARIA DE LA REALIZACIÓN DE “LASIK”
(LASER IN SITU QUERATOMILEUSIS) CON MICROQUERATOMO
MECÁNICO Y CON LÁSER DE FEMTOSEGUNDO.**

Tesis Doctoral

Pilar Cañadas Suárez

Madrid 2013

TESIS DOCTORAL



**Estudio con microscopía confocal del efecto sobre la densidad queratocitaria
de la realización de “LASIK” (Laser in situ keratomileusis) con
microqueratomo mecánico y con láser de femtosegundo.**

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Óptica y Optometría

Memoria presentada para optar al grado de doctor por la
universidad Complutense de Madrid

Pilar Cañadas Suárez

Madrid, 2013

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID



ESTUDIO CON MICROSCOPIA CONFOCAL DEL EFECTO SOBRE LA DENSIDAD QUERATOCITARIA DE LA REALIZACIÓN DE “LASIK” (LASER IN SITU QUERATOMILEUSIS) CON MICROQUERATOMO MECÁNICO Y CON LÁSER DE FEMTOSEGUNDO.

Pilar Cañadas Suárez

Directores : *Dr. D. Miguel A. Teus Guezala*

Dr. D. José Luis Hernández Verdejo

Dra. Dña. Laura de Benito Llopis.

A mis mejores maestros: A Manuel Cañadas Serrano, mi padre. Porque no hay día que no eche de menos tu actitud docente como forma de vida y porque sé que estarías orgulloso de ver esta tesis terminada. A Magdalena Suárez Robles, mi madre. Por enseñarme a luchar por lo que quiero y ser un ejemplo de fortaleza y cariño.

Agradecimientos

Quiero dedicar unas líneas de agradecimiento a todas las personas que de una forma u otra me han ayudado y que sin su apoyo esta Tesis no sería posible.

Quiero agradecer al Dr. Miguel Ángel Teus Guezala su confianza en mí desde el principio, gracias por brindarme la posibilidad de realizar esta Tesis Doctoral, por introducirme en la investigación, por tu disponibilidad ante cualquier duda surgida durante el proceso y por ser un referente del trabajo bien hecho.

Gracias Dr. Jose Luis Hernández Verdejo, por mostrarme otra cara de la optometría, por contagiarme tu pasión por nuestra profesión, por ser una referencia a seguir y sobre todo por la confianza que has depositado en mí y que espero seguir disfrutando.

Gracias Dra. Laura de Benito Llopis por tu ayuda en cada paso de esta Tesis Doctoral, por tu generosidad, por tu paciencia, gracias por tu comprensión y tu pasión por la perfección y el buen hacer, y por dedicarme tu tiempo en tantos momentos.

Gracias al equipo de optometristas, oftalmólogos, auxiliares y enfermeras de Vissum Madrid por ayudarme en todo lo que he necesitado y por demostrar que son unos grandes profesionales incluso en tiempos difíciles.

Gracias a mis compañeros del departamento de optometría de la Universidad Europea de Madrid (a los que están y a los que estaban) especialmente a Alicia, Borja, Diana, Silvia y Carmen, por aguantar mis agobios. A César y Cristina, por confiar en mis posibilidades.

A mis hermanos Manuel y Juan Alonso y a mis cuñadas porque sin vuestra ayuda y apoyo NADA es posible. A mis sobrinos por hacernos felices cada día.

A mis amigos por estar ahí SIEMPRE.

Y a ti Pablo, por ser mi compañero en este camino, y en los que nos quedan...

Gracias a todos.

...I'll see you through your bad times

I'll see you through your fears

I'll see you through your hang ups

Honey I'll dry all your tears

And when the tempest is raging

I want you to know got a friend that's true

Just like a shelter, in a time of storm

I'll see you through, that's what I'll do...

Just like a Shelter (Lloyd Charmers)

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	19
1.1 La córnea.....	19
Cálculo del poder refractivo corneal	20
Aporte nervioso	21
Aporte de oxígeno y nutrientes	21
Película lagrimal.....	22
1.2 Anatomía corneal	23
Celularidad corneal	23
Epitelio corneal	24
Mantenimiento del epitelio.....	26
La membrana basal	27
La capa de Bowman	28
Estroma corneal:.....	29
La membrana de Descemet	38
Endotelio	39
1.3 Introducción a la cirugía refractiva	40
Evolución de la cirugía refractiva	42
Queratectomía fotorrefractiva	45
Queratectomía subepitelial asistida por láser excimer (LASEK).....	45
Queratomileusis in situ con láser excimer (LASIK)	46
LASIK con láser de femtosegundo	47
1.4 Microscopía confocal	53
Historia del microscopio confocal.....	54
Principios ópticos de la microscopía confocal	55
Diseños de microscopía confocal in vivo.....	56
Microscopio confocal de barrido en Tándem (MCBT).....	56
Microscopio confocal de barrido en hendidura (MCBH).....	58
Microscopio confocal de barrido Láser (MCBL).....	58
1.5 Observación de la córnea normal con microscopía confocal	60
Observación del epitelio corneal	60
Observación de los nervios sub-basales	61
Observación de la capa de Bowman.....	62
Observación del estroma corneal	63
Observación de la membrana de Descemet.....	63
Observación del endotelio corneal	63

1.6 Aplicaciones clínicas del microscopio confocal	64
1.7 Respuesta corneal ante la cirugía refractiva	66
Respuesta biomecánica	66
Cicatrización tisular.....	68
1.8 Densidad de queratocitos y mantenimiento del estroma	76
1.9 Estudios con microscopía confocal de la densidad queratocitaria tras cirugía refractiva ..	77
Estudios con microscopía confocal para evaluar la respuesta estromal frente a la cirugía de superficie	77
Estudios con microscopía confocal para evaluar la respuesta estromal frente al LASIK ...	78
Estudios con microscopía confocal para evaluar la respuesta estromal frente al LASIK-FS	80
Cálculo de la densidad de queratocitos	82
2. JUSTIFICACIÓN	84
3. HIPOTESIS.....	85
4. OBJETIVOS	86
5. MATERIAL Y MÉTODO	87
Población muestral	87
Criterios de exclusión generales.....	87
Criterios de inclusión	87
Examen preoperatorio	88
Técnica quirúrgica.....	88
Seguimiento postoperatorio.....	90
Microscopía confocal in vivo	91
Montaje del microscopio.....	91
Procedimiento de toma de imágenes en los pacientes.....	94
Medida de la densidad de queratocitos.....	95
Profundidades a las que medimos la densidad de queratocitos.....	97
Análisis estadístico.....	100
6. RESULTADOS.....	102
FS-LASIK vs Controles	102
MK-LASIK vs controles	105
FS-LASIK vs MK-LASIK	107
3 meses después de las cirugías.....	107
15 meses tras las cirugías.	109
3 a 5 años tras las cirugías.....	111
7. DISCUSIÓN	114
7.1 Método para medir la densidad queratocitaria con el microscopio confocal Heidelberg retina Tomograph ii (HRTII) usando el módulo de córnea Rostock (MCR)	114
7.2 Densidad queratocitaria en población joven candidata a cirugía refractiva corneal	117

7.3 Medida de la densidad queratocitaria en distintas profundidades en los grupos de pacientes operados con MK- LASIK Y FS-LASIK	118
7.4 Densidad queratocitaria tras MK LASIK y tras FS LASIK	121
7.5 Limitaciones de nuestro trabajo	127
8. CONCLUSIONES	129
9. CONCLUSIONS.....	131
ANEXO I	133
ANEXO II.....	134
10. BIBLIOGRAFÍA.....	135

INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

Figura 1. Corte histológico de la córnea completa.....	23
Figura 2. Hipótesis xyz. [x (proliferación de células basales epiteliales) + y (proliferación de células limbares y migración centripeta) = z (pérdida de las células epiteliales superficiales)] .	26
Figura 3. Estroma corneal bajo microscopía electrónica. Estructura lamelar y organizada de las fibras de colágeno y uniones gap entre los procesos celulares de los queratocitos en la córnea humana.	30
Figura 4. Vista tridimensional de los queratocitos de la córnea de una rata después de eliminar el colágeno. Se puede apreciar la red que forman los queratocitos.....	31
Figura 5. Imagen mediante microscopía confocal de <i>haze</i> en una córnea humana in-vivo.	32
Figura 6. Esquema de la distribución celular en la córnea.....	34
Figura 7. Esquema del comportamiento elástico.	35
Figura 8. Esquema del comportamiento viscoelástico	35
Figura 9. Imagen de una célula endotelial bajo microscopía electrónica. Se pueden apreciar los orgánulos citoplasmáticos (mitocondria, retículo endoplasmático, ribosomas y aparato de Golgi).	39
Figura 10. Esquema de la actuación del láser femtosegundo en el estroma corneal. Creación de burbujas de cavitación.....	50
Figura 11. Esquema del microscopio confocal de barrido en tándem.....	57
Figura 12. Imagen del microscopio confocal <i>Heidelberg retina Tomograph ii</i> junto con el módulo de córnea <i>Rostock</i> (MCR).	58
Figura 13. Esquema del enfoque del microscopio confocal sobre el tejido corneal.	59
Figura 14. Observación de las células epiteliales superficiales y aladas con el microscopio confocal HRT II.	61
Figura 15. Observación de las células epiteliales basales de una córnea humana con el microscopio HRTII.	61
Figura 16. Observación de los nervios corneales sub-basales de una córnea humana observados con el microscopio confocal HRT II.....	62
Figura 17. Observación de la capa de Bowman de una córnea humana con el microscopio confocal HRTII.	62
Figura 18. Observación del estroma corneal de una córnea humana con el microscopio confocal HRTII.	63
Figura 19. Observación del endotelio corneal de una córnea humana con el microscopio confocal HRTII.	64
Figura 20. Imagen del microscopio confocal <i>Heidelberg retina Tomograph ii</i> sin el módulo de córnea <i>Rostock</i>	91

Figura 21. Imagen del microscopio confocal <i>Heidelberg retina Tomograph II</i> junto con el módulo de córnea <i>Rostock</i>	92
Figura 22. Gel “ <i>Viscotears</i> ” aplicado en la superficie de la lente del módulo de córnea <i>Rostock</i>	93
Figura 23. Lente del módulo de córnea <i>Rostock</i> con el gel aplicado y el capuchón.	93
Figura 24. Modo de resetear el microscopio confocal <i>Heidelberg retina Tomograph ii</i> : reflejo brillante en el programa de ordenador del microscopio confocal. En este momento ponemos el enfoque a 0 (pulsando la tecla reset de la pantalla).	94
Figura 25. Esquema del contacto del microscopio confocal con la córnea del paciente.....	95
Figura 26. Método de selección manual de células para obtener la densidad de queratocitos a una profundidad determinada.	96
Figura 27. Esquema de las profundidades a las que se registran las medidas de la densidad de queratocitos en la córnea.	84
Figura 28. Representación de la densidad de queratocitos a los 3 meses. Comparación FS-LASIK y MK-LASIK. Diferencia estadísticamente significativa.....	108
Figura 29. Representación de la densidad de queratocitos a los 15 meses. Comparación FS-LASIK y MK-LASIK.	111
Figura 30. Representación de la densidad de queratocitos a los 3-5 años. Comparación FS-LASIK y MK-LASIK.	113
 Tabla 1. Principales diferencias en los parámetros de los láseres femtosegundo disponibles comercialmente.....	52
Tabla 2. Densidad de queratocitos en córneas normales en distintas profundidades estromales.....	77
Tabla 3. Datos preoperatorios de los casos incluidos en la cirugía láser in situ keratomileusis con microqueratomo (MK-LASIK) y con láser femtosegundo (FS-LASIK) para crear el flap, comparado con un grupo control de córneas sanas no operadas.....	102
Tabla 4. Comparación de la densidad de queratocitos en córneas sanas no operadas (grupo control) y en casos después de laser in situ keratomileusis con un láser femtosegundo (FS-LASIK) a los 3 meses, 15 meses y 3 a 5 años después de la cirugía. Media del flap: media entre subepitelio, 25 μ m bajo Bowman y 50 μ m bajo Bowman. Estroma medio: 200 μ m sobre endotelio. Estroma posterior: 50 μ m sobre endotelio. Media total: media entre el estroma anterior (media del flap +lecho estromal), estroma medio y estroma posterior. Los datos se muestran como: media \pm desviación estándar (rango) y están expresados como cel/mm ³	104
Tabla 5. Comparación de la densidad de queratocitos en córneas normales no operadas (grupo control) y los casos después de laser in situ keratomileusis con un microqueratomo mecánico	

(MK-LASIK) 3 meses, 15 meses y a los 3 a 5 años después de las cirugías. Media del flap: media entre subepitelio, 25 μm bajo Bowman y 50 μm bajo Bowman. Estroma medio: 200 μm sobre endotelio. Estroma posterior: 50 μm sobre endotelio. Media total: media entre el estroma anterior (media del flap +lecho estromal), estroma medio y estroma posterior. Los datos se muestran como: media \pm desviación estándar (rango) y están expresados como cel/mm^3 106

Tabla 6. Comparación de la densidad de queratocitos después de laser in situ keratomileusis con microqueratomo mecánico (MK-LASIK) y láser femtosegundo (FS-LASIK) 3 meses después de las cirugías. Los datos se muestran como: media \pm desviación estándar (rango) y están expresados como cel/mm^3 107

Tabla 7. Comparación de la densidad de queratocitos después de laser in situ keratomileusis con microqueratomo mecánico (MK-LASIK) y láser femtosegundo (FS-LASIK) 15 meses después de las cirugías. Los datos se muestran como: media \pm desviación estándar (rango) y están expresados como cel/mm^3 109

Tabla 8. Comparación de la densidad de queratocitos después de laser in situ keratomileusis con microqueratomo mecánico (MK-LASIK) y láser femtosegundo (FS-LASIK) 3-5 años después de las cirugías. Los datos se muestran como: media \pm desviación estándar (rango) y están expresados como cel/mm^3 112

ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ATP	Adenosin trifosfato
AK	Queratotomía astigmática (<i>Astigmatic Keratotomy</i>)
ALK	Queratectomía automatizada lamelar (<i>Automated Lamellar Keratectomy</i>)
AVcc	Agudeza visual mejor corregida
D	Dioptrías
DLK	Queratitis lamelar difusa (<i>Diffuse lamellar keratitis</i>)
VEGF	Factor de crecimiento vascular endotelial (<i>Vascular endothelial growth factor</i>)
FS	Femtosegundo
HRT	<i>Heidelberg Retina Tomograph</i>
LASEK	Queratectomía subepitelial asistida por láser excímer (<i>Laser-assisted Subepithelial Keratectomy</i>)
LASIK	Queratomileusis in situ con láser excímer (<i>Laser in Situ Keratomileusis</i>)
MCBH	Microscopio confocal de barrido en hendidura
MCBL	Microscopio confocal de barrido láser
MCBT	Microscopio confocal de barrido en tándem
MCR	Módulo de córnea <i>Rostock</i>
MK	Microqueratomo (<i>Microkeratome</i>)
MMC	Mitomicina C
PIO	Presión intraocular
PK	Queratoplastia penetrante (<i>Penetrant Keratoplasty</i>)
PRK	Queratectomía fotorrefractiva (<i>Photo Refractive Keratectomy</i>)
RK	Queratotomía radial (<i>Radial Keratectomy</i>)
TGF β	Factor de crecimiento β

TUNEL Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP

RESUMEN

Introducción: La respuesta del estroma corneal ante las distintas cirugías refractivas es objeto de estudio y debido a la aparición de nuevos métodos para la obtención del flap en la cirugía refractiva, tales como el láser de femtosegundo (FS), se hace necesario el estudio de la respuesta que éstos presentan en la curación de la córnea ante esa agresión. El microscopio confocal es un arma muy útil para evaluar los posibles cambios a largo plazo que pueden surgir tras la aplicación de dichos nuevos métodos. No hay estudios que analicen la respuesta celular estromal in vivo de la córnea humana tras el uso del láser de FS a largo plazo y lo comparen con la respuesta ante el uso del microqueratomo mecánico (MK). Por todo esto desconocemos si el uso de un láser de FS genera una respuesta celular diferente en el estroma y si hay cambios en la densidad de queratocitos en las córneas sometidas a este procedimiento y compararlas con la respuesta obtenida en córneas operadas con MK. Éste ha sido nuestro objetivo principal.

Material y Método: Hemos realizado un estudio prospectivo con pacientes a los que se les sometió a cirugía LASIK con MK y LASIK asistido con láser de FS. Hemos calculado la densidad de queratocitos mediante microscopía confocal a los 3 y 15 meses y 3-5 años después de las cirugías y las hemos comparado entre ellas y con córneas sanas no operadas.

Resultados: Se han incluido un total de 89 ojos. 31 en el grupo de LASIK asistido con FS, 30 en el grupo de LASIK asistido con MK y 28 en el grupo control.. A los 3 meses de las cirugías hemos encontrado un aumento en la población queratocitaria de toda la córnea, principalmente debido a las capas estromales media y posterior en ambos grupos de tratamiento. También hemos encontrado un aumento en el lecho estromal

después de MK-LASIK, pero no después FS-LASIK. Posteriormente se produjo una normalización y estabilización de la densidad celular en ambos grupos en las capas estromales profundas a los 15 meses de las cirugías. La densidad queratocitaria en el flap estromal y en el lecho estromal disminuyó a los 15 meses después de FS- y MK-LASIK comparado con las densidades obtenidas a los 3 meses y comparadas con el grupo control . Se mantuvo estable después de ese periodo. Aun encontrando esta depleción queratocitaria a este nivel, la media de la densidad celular en toda la córnea no se encontraba disminuida cuando la comparamos con el grupo control en ninguna de las revisiones postoperatorias.

Conclusión: Hemos encontrado una reorganización de la densidad queratocitaria después de LASIK, con un aumento inicial, seguido de una disminución en el flap estromal y en el lecho estromal a los 15 meses de las cirugías, pero manteniendo una densidad media normal en toda la córnea. No hemos encontrado diferencias entre MK and FS-LASIK.

SUMMARY

Introduction:

The introduction of femtosecond lasers (FS) has increased the predictability during the creation of the stromal flap for laser in situ keratomileusis (LASIK). Interest on the differences between FS-obtained flaps and the ones obtained by a mechanical microkeratome (MK) has mainly focused on the optical aspects of the flaps. Only a few studies have analysed the response in vivo of the human cornea to the use of a FS laser, studying the activation of keratocytes 3 months postoperatively, or the interface characteristics compared with a MK-obtained flap. However, none of them deal with the possible long-term changes of keratocyte density after the use of a FS laser. In contrast, several studies have dealt with the keratocyte density years after MK-LASIK and surface ablation procedures, showing a postoperative decrease in the stromal bed.

To see whether the use of a FS laser generates a different cellular response in the corneal stroma, we decided to study the changes in keratocyte density in corneas that underwent FS-LASIK, comparing them to normal non-operated corneas and to MK-LASIK-operated corneas.

Patients and methods

We performed a prospective study of consecutive eyes that underwent LASIK to correct their myopic error (with or without astigmatism). Eyes were separated into two groups depending on the method used to create the flap: the FS-LASIK group included those in which the 60-kHz Intralase was used (Intralase Corp, Irvine, California, USA). The MK-LASIK group included those in which the flap was created using the Moria M2 microkeratome (Moria SA, Antony, France). The patients chose MK-LASIK or FS-

LASIK after being fully informed about the advantages and disadvantages of each technique. A group of healthy non-operated corneas served as controls.

When both eyes of the same patient fulfilled the inclusion criteria, only the right eye was included for analysis.

We excluded patients with unstable refraction and keratoconus suspects, cases with previous ocular surgery (refractive or other surgical procedures) and those with a systemic disease that could alter the wound healing process, such as diabetes or connective tissue disorders.

All study patients underwent a full ophthalmologic examination before surgery that included the measurement of uncorrected visual acuity (UCVA), the BSCVA (using a Snellen chart [Nidek auto chart projector CP 670; Nidek Co, Ltd, Gamagori, Japan] and including manifest and cycloplegic refractions), slit-lamp biomicroscopy, tonometry (CT-80; Topcon, Tokyo, Japan), corneal pachymetry (DGH 5100 contact pachymeter; DGH Technology, Inc, Exton, Pennsylvania, USA), keratometry and corneal topography (CSO; Compagnia Strumenti Oftalmici, Firenze, Italy), mesopic pupil measurement (Colvard pupillometer; Oasis, Glendora, California, USA), and funduscopy.

IRB's approval from the "Comité de Ética e Investigación Clínica" of Hospital Universitario La Princesa (Madrid, Spain) and patients' informed consent for surgery and for participation in this research were obtained

Surgical technique

Two surgeons (M.A.T., L.B.L.) performed all the procedures. In the MK-LASIK group, the Moria M2 microkeratome was used to create the flap. The suction rings (+2, +1, 0,

or - 1) were selected depending on the preoperative corneal curvature and following the manufacturer's nomogram. The cutting head used was 110 μm in all cases.

In the FS-LASIK group, the 60-kHz IntraLase was used to create the flap, using the following parameters: raster pattern, a bed energy level of 0.90 μJ , a side-cut energy of 0.90 μJ , a spot separation of 7 μm , a 70 degree side cut, a hinge angle of 50 degrees, an attempted flap depth of 110 μm , and a flap diameter of 9mm.

In both groups, the ablation was performed using the Esiris Schwind excimer laser (Schwind Eye Tech Solutions, Kleinostheim, Germany) using a conventional treatment algorithm. The stroma was then rinsed with balanced salt solution and the flap was put back in place. Antibiotic drops (ofloxacin 3 mg/mL) and nonsteroidal anti-inflammatory drops (ketorolac trometamol 5 mg/mL) were applied.

Postoperative follow-up

Postoperatively, all patients used preservative-free artificial tears as needed and were instructed to apply topical antibiotic drops (ofloxacin 3 mg/mL) 4 times daily for 1 week. Steroid drops (dexamethasone 1 mg/mL) were used 4 times daily in the MK-LASIK group and 8 times daily in the FS-LASIK group during the first postoperative week, based on the expected higher risk of diffuse lamellar keratitis (DLK) after FS laser surgery reported in the literature.

Examinations were scheduled at 1 day, 1 week, and 1, 3 and 15 months and 3 to 5 years postoperatively. Confocal microscopy was performed at the 3, 15-month and in the 3 to 5 years postoperative visits.

In vivo confocal microscopy and keratocyte density measurement

Laser scanning in vivo confocal microscopy was performed using the Heidelberg Retina Tomograph II with the Rostock Cornea Module (HRTII/RCM; Heidelberg Engineering, Heidelberg, Germany). This microscope uses a 670-nm red wavelength diode laser source. A X60 objective water immersion lens with a numerical aperture of 0.9 (Olympus, Tokyo, Japan) was used. The dimensions of the images obtained using this lens are 400 x 400 μm , and the manufacturer quotes the transverse resolution and optical section thickness of 1 and 4 μm , respectively. The RCM uses an entirely digital capture system. The device can scan automatically through 80 μm of the cornea, at any depth, capturing 30 frames/s, but to obtain a scan of the entire cornea, the microscope needs to be advanced manually through the full thickness of the cornea. The method of examination was as follows: each eye was anesthetized with 1 drop of 1% tetracaine chlorohydrate (Alcon Cusi Laboratories, Barcelona, Spain). Viscotears (Carbomer 980, 0.2%; Novartis, North Ryde, Australia) was used as a coupling agent between the applanating lens cap and the cornea. During the examination, all subjects were asked to fixate on a distance target aligned to enable examination of the central cornea. The lens then was advanced manually until it contacted the cornea. The full thickness of the central cornea was scanned. The total duration of in vivo confocal examination was approximately 2 minutes per eye, and none of the subjects experienced any visual symptoms or complications as a result of the examination.

The trained examiner, blinded to the type of surgery performed, took 3 scans of each eye and selected for analysis the one with less motion artefacts.

Then she manually selected the cell nuclei in each digital image covering 400 x 400 μm of cornea. The keratocyte density provided by the computer and expressed in cells/ mm^2 was then transformed into volumetric density.

At each determined depth of study, three images were analyzed: the one that most exactly corresponded to the desired depth and the images just anterior and posterior, with a difference between them of less than 20 μm . Cells were counted in the three images and the mean was obtained.

The images were analyzed at the following depths: 1) sub-epithelium (first good-quality image of the keratocytes under the epithelium); 2) 25 μm under Bowman's layer; 3) 50 μm under Bowman's layer; 4) stromal bed (just below the interface); 5) mid stroma (200 μm above the endothelium); 6) deep stroma (50 μm above the endothelium). We considered the density within the flap ("flap average") as the mean between the density at the sub-epithelial layer, at the 25 μm deep layer and 50 μm deep layer. Total cornea average was calculated as the mean between anterior stroma (average between flap and stromal bed), mid stroma and posterior stroma.

In the control group, corresponding depths were analysed. We calculated the depth of ablation performed in the treatment groups and added the flap thickness, and measured in the control group the cell density at the layer that would have become stromal bed had they undergone the same surgery. Since the mean programmed ablation in the LASIK groups was: sphere -1.88 D, and cylinder -0.96 D, we calculated, following the parameters of our laser, the stromal ablation performed, which was 40 μm on average. To that we added the 110 μm of flap thickness expected to have been obtained with both the FS laser and the MK. Therefore, the keratocytes were measured at 150 μm deep in control eyes to compare it to the "stromal bed" layer of treated eyes.

Statistical analysis

The Statview+Graphics TM (Abacus Concept Inc., Cupertino, CA) was used for data analysis. Statistical comparisons between the three groups were done with the factorial ANOVA and comparisons between two groups were done with the Student t-test. The

Bonferroni correction for multiple comparisons was used when appropriate. $P < 0.05$ was considered statistically significant and continuous data are expressed as the mean \pm standard deviation.

Results

Eighty-nine eyes were included: 31 eyes in the FS-LASIK group, 30 in MK-LASIK group and 28 in the control group. Control patients were selected from volunteers of the same age population (younger than 40 years); they were healthy and young patients with mild to moderate myopia. Table 3 shows the preoperative data in both groups.

FS-LASIK vs controls

The comparison between the control group and the FS-LASIK group is shown in table 4. Keratocyte density throughout the stromal flap (flap average) and in the stromal bed was decreased 15 months after the surgery compared to 3 months postoperatively and compared to controls. It seemed to remain stable afterwards, with no statistically significant difference between the density measured 15 months and 3-5 years after the surgery.

In contrast, in the mid and deep stroma, the cellularity was significantly increased compared to controls 3 months after surgery, and then decreased towards normal levels in the subsequent visits. This increase in deeper layers caused the total average cell density to be significantly higher than controls 3 months after the surgery and non-different from controls in the subsequent visits, in spite of the lower keratocyte density within the flap and stromal bed detected in those visits.

MK-LASIK vs controls

After MK-LASIK, we found that the corneal cell density changes over time exhibited a similar pattern after MK-LASIK than the one described after FS-LASIK, with the exception of the cell density in the stromal bed 3 months after MK-LASIK being

significantly increased compared to controls, as opposed to the FS-LASIK group, where such difference was not detected.

FS-LASIK vs MK-LASIK

Between both techniques we found no differences in the total average cell density in any of the postoperative visits. Although the majority of the measurements showed a higher cell density after MK-LASIK compared to FS-LASIK, the only differences that reached statistical significance were the measurements at the stromal bed 3 months postoperatively and within the flap 3-5 years following surgery.

Discussion

We detected in our study a reorganization of stromal cellularity after LASIK, with an initial increase in the keratocyte population of the whole cornea, due to an increase in the density in mid and deep layers (and in the stromal bed in the MK-LASIK group), followed by a tendency towards normalisation of the cell density in those deeper layers, along with a decrease of the cell population within the stromal flap and stromal bed 15 months after surgery, that seemed to remain stable thereafter up to 3 to 5 years postoperatively. Despite this decrease in the anterior keratocyte density, the average population throughout the cornea was not significantly decreased compared to controls. The cell changes after both techniques showed a similar pattern, with no differences in the total average cell density between both techniques at any time point.

The corneal wound healing response after MK-LASIK has been previously described as leading to a hypocellular scar. Other in vivo studies have also shown a decreased keratocyte density in the stromal flap and stromal bed from 1 year up to 5 years after MK-LASIK.

To the best of our knowledge, there are no previous human studies dealing with long-term keratocyte population changes after FS-LASIK. The short-term effect of the FS laser on corneal cell population has been the subject of several animal studies, which have shown cell necrosis within the first hours after the FS laser cut, followed by inflammatory infiltration and keratocyte replication. Compared with a MK, the FS laser seems to induce more keratocyte necrosis, stronger inflammatory response, and increased keratocyte proliferation when higher energy levels are used. With the low energy levels of the 60 kHz FS laser, as the ones used in our study, differences in cell death and inflammation are not significant compared to a MK, but there seems to be a higher keratocyte replication in the borders of the flap. However, we were surprised to find a lower increase in keratocyte density in the stromal bed 3 months after the surgery with FS laser compared with our MK-LASIK group. Since our measurements were taken within the central cornea, possible differences in the borders of the flap might not have been detected. Our steroidal regime, higher after FS-LASIK, could have also played a role, although previous reports do not support an effect of the steroids in significantly modulating keratocyte replication after FS-LASIK.

When only the FS laser is used, without sidecut to avoid epithelial damage, and without flap lifting or excimer laser ablation, there seems to be no significant activation of the keratocytes. If the cut is done with a MK, not followed by excimer laser ablation, one study in rabbits report not significant changes in the keratocyte population 6 weeks after the surgery (although the data reported showed that the post-cut population was higher than preoperatively, especially within the stromal flap, and the possibility of a lack of statistical power should be taken into account). If the main causes of the keratocyte response were the damaged epithelium and possibly the subsequent excimer laser

ablation, then long-term differences between FS-LASIK and MK-LASIK would not be expected.

In our study, we found an increase in the stromal cell population 3 months after the surgery, mainly due to an increase in the mid and deep stromal layers, but also within the stromal flap in both groups (at 25 and 50 μm), and in the stromal bed after MK-LASIK. The increase in deeper layers has already been described after MK-LASIK and after surface ablation. The fact that the keratocyte depletion within the flap is not found 3 months after the surgery, but later on, has also been described before and is consistent with the hypothesis that after a corneal injury, there is an initial apoptosis of the keratocytes around the wounded tissue, that triggers a repopulation response. After LASIK, this repopulation response seems to happen not only in the stromal bed, but also in the area overlying the wounded tissue, within the stromal flap, and in deeper layers.

The cause of the subsequent decrease in keratocyte density in the stromal flap and stromal bed is still unknown. None of the patients of this study showed any changes suggesting post-LASIK ectasia. The consequences of the keratocyte depletion in the stromal flap and stromal bed on the long-term corneal stability after LASIK is unclear, and one study showed a similar decrease in keratocyte population after LASIK in corneas that had developed postoperative ectasia and in corneas with normal postoperative follow-up. Our results show that, even with the depletion of keratocytes within the flap, the whole cornea seems to maintain a stable average number of cells after the surgery. The possibility of the stroma being repopulated by cells derived from the bone marrow leads to think it very improbable that an operated cornea could develop a critically low number of keratocytes many years after the surgery.

We noticed that the optical section thickness of our microscope (measured with the method described by McLaren et al.) differed significantly from the one provided by the manufacturer (4 μm) and also from other HRTII-RCM reported in the literature (7.6 μm , 7.8/9.1 μm). It is important, therefore, that each RCM user calculates the optical section thickness of his/her own device before translating the measurements from area to volume.

The limitations of using confocal microscopy to assess keratocyte density could be affecting our results: the possibility of anterior-posterior movement of the subject and the subjectivity of the manual cell counting. We tried to decrease both sources of error by performing 3 scans in each eye and selecting the one with the least motion and by having the same person assessing all the scans. A study comparing the results of keratocyte density measurements performed manually and with an automated program showed that, despite differences in the final cell densities, the conclusions regarding the change of cell densities after surgery would have been the same. The high contrast images obtained with the HRTII RCM also help decrease the variability in the manual assessment.

Our study suggests that the keratocytes undergo a postoperative reorganisation up to 5 years after LASIK, with an initial increase in density, followed by a late decrease of cells in the stromal flap and stromal bed, but still maintaining normal average cell densities in the total cornea, and with no significant differences between MK and FS-LASIK. It is evident that more studies with larger number of eyes are necessary to fully understand the effect of laser excimer refractive surgery on the corneal keratocyte population.

Conclusion

We found a reorganization of keratocytes density after LASIK, with an initial increase, followed by a decrease in the stromal flap and stromal bed 15 months postoperatively, and stable from then onwards, but still maintaining normal average densities in the total cornea. There were no differences between MK and FS-LASIK.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 LA CÓRNEA

La función visual depende del correcto funcionamiento de varias estructuras oculares y una de ellas es la córnea. La córnea constituye una unidad estructural y funcional debido a que es un tejido óptico transparente, incoloro, avascular, provisto de terminaciones nerviosas y carente de vasos linfáticos. Actúa como superficie refractiva para transmitir la luz y enfocar la imagen sobre la retina, proporciona una barrera física con el medio ambiente y gracias a los componentes celulares y químicos de la conjuntiva y de la película lagrimal, la superficie corneal sirve de protección contra los potenciales agentes patológicos.¹

La superficie corneal anterior está cubierta por la película lagrimal mientras que la superficie corneal posterior está directamente bañada por el humor acuoso. El limbo corneal está altamente vascularizado y contiene un reservorio de células madre, siendo éste una zona de transición entre la córnea transparente y la esclera opaca.¹

La córnea anterior es una superficie convexa, asférica y transversalmente ovalada debido a la escleralización en la zona superior e inferior.² En humanos adultos la córnea mide horizontalmente de 11 a 12 mm y verticalmente de 9 a 11 mm. Tiene un espesor de 500 μm en el centro con un aumento gradual hacia la periferia donde alcanza unas 700 μm .³

La curvatura de la córnea tampoco es constante, siendo ésta mas curva en el centro y menos en la periferia. Los radios de curvatura en los 3 mm centrales, donde la superficie corneal se considera casi esférica, oscilan entre los 7.5 mm y 8 mm.

La interfase aire - película lagrimal es responsable del 60 al 70% del poder refractivo total del ojo y su poder dióptrico oscila entre 40 dioptrías (D) y 44 D.

La córnea debe sus propiedades ópticas a su transparencia, la uniformidad en su superficie y su índice de refracción.² Debido a éstas, es capaz de transmitir la luz y proyectarla sobre la retina con la ayuda del enfoque del cristalino.

Esta transparencia corneal se debe en parte a la uniformidad de sus componentes. Posteriormente haremos referencia a la disposición especial de las fibras de colágeno, la alineación de los queratocitos (células estromales) y sus prolongaciones que en estado quiescente no van a interferir en la transparencia corneal. Si la separación entre las fibras de colágeno y el diámetro de las mismas difieren de la considerada normal, la córnea experimentará una falta de transparencia, ya que los rayos de luz incidentes se dispersarían de forma aleatoria.^{2,3}

CÁLCULO DEL PODER REFRACTIVO CORNEAL

Para realizar el cálculo del poder refractivo de la córnea debemos tener en cuenta los índices de refracción de sus interfases anterior y posterior, así como de las propiedades de transmisión del propio tejido. Estos índices son 1.00, 1.336, 1.376 y 1.336 en el aire, la película lagrimal, el tejido corneal y el humor acuoso respectivamente. Podemos calcular la potencia de su superficie aplicando la fórmula $(n' - n / R)$ teniendo en cuenta R es el radio de curvatura en metros y n y n' los índices de refracción de las superficies. Para un radio de curvatura entre 7,5mm y 8mm la potencia de la córnea es de +40 a +44D.¹

APORTE NERVIOSO

La córnea, al ser un tejido avascular, recibe la regulación necesaria para su reparación por medio de la alta inervación que posee. De hecho, es uno de los tejidos más inervados y por tanto más sensibles del cuerpo humano. La densidad de las terminaciones nerviosas en la córnea es de 300 a 400 veces mayor que en la piel. Una degeneración de los nervios sensoriales de la rama del trigémino puede dar lugar en la córnea a un retraso en la curación del daño corneal como sucede en la úlcera corneal neurotrófica. El origen de los nervios corneales son los nervios ciliares de la rama oftálmica del nervio trigémino. Estos nervios ciliares se unen formando el anillo perilimbar periférico y las fibras nerviosas penetran en la córnea en el estroma más profundo y se dirigen radialmente hacia las capas más superficiales formando el plexo subepitelial.⁴ Para mantener la transparencia corneal, las fibras nerviosas corneales pierden su mielina muy cerca del punto donde penetran en la córnea, a nivel de la capa de Bowman, y terminan al mismo nivel en el que se encuentran de las células aladas del epitelio. Si el epitelio corneal superficial se pierde, las terminaciones nerviosas quedarán expuestas dando lugar a un dolor ocular severo.^{4,5}

APORTE DE OXÍGENO Y NUTRIENTES

Aunque la córnea es un tejido avascular, sí que contiene factores derivados de la sangre cuyo papel es crucial en el metabolismo corneal y en la curación de las heridas. Las arterias ciliares anteriores, que proviene de la arteria oftálmica, forma una arcada vascular en la región limbal corneal y se anastomosa con los vasos derivados de la rama facial que proviene de la arteria carótida externa. Por lo tanto, podemos afirmar que la córnea está nutrida mediante componentes sanguíneos aportados por las arterias carótidas interna y externa.⁶

Las células epiteliales y endoteliales son metabólicamente activas por lo que requieren adenosin trifosfato (ATP) como fuente de energía en condiciones aeróbicas. El ATP se obtiene a partir de la glucólisis por lo que el aporte de glucosa y oxígeno es esencial para mantener el metabolismo normal de las células corneales y para mantener las funciones propias de la córnea.⁶ La glucosa llega a la córnea por difusión desde el humor acuoso. Sin embargo el oxígeno proviene de la lágrima, la cual lo capta directamente del aire. Debido a esta forma de captación de oxígeno la exposición de la película lagrimal directamente a la atmósfera es necesaria para la oxigenación corneal y por tanto, la interrupción del aporte de oxígeno a la córnea puede dar lugar a hipoxia corneal y como consecuencia de ello, edema.⁶

PELÍCULA LAGRIMAL

La película lagrimal suele dividirse en 3 capas, aunque éstas no están bien diferenciadas: una capa superficial de lípidos de aproximadamente 0,1 micras (μm), una capa acuosa de aproximadamente 7 μm y una mucínica de entre 0,02 μm y 0,05 μm . El 90% del volumen lagrimal es agua, pero el fluido lagrimal también contiene muchas moléculas e iones importantes: electrolitos, glucosa, inmunoglobulinas, lactoferrina, lisozima, albúmina, oxígeno, histamina, prostaglandinas, factores de crecimiento y citoquinas.^{3,7,8} Debido a todos estos componentes, la película lagrimal sirve como lubricante y como una fuente de nutrientes y de factores de regulación requeridos para el mantenimiento del epitelio y para su reparación.⁸

La capa lipídica está formada por la secreción de las glándulas de Meibomio y otras glándulas secretoras localizadas en el párpado como son glándulas de Zeiss y Moll. La capa acuosa está creada por la glándula lagrimal principal y las glándulas accesorias de Krause y Wolfring. Por último, la capa mucínica está formada por la

secreción de las células caliciformes, las cuales están localizadas en el epitelio conjuntival.⁷

1.2 ANATOMÍA CORNEAL

CELULARIDAD CORNEAL

Las células que forman la córnea están distribuidas en 3 capas diferenciadas (epitelio, estroma y endotelio) y además se pueden observar dos interfases (capa de Bowman y membrana de Descemet). Los tipos de células que componen la córnea son: células epiteliales, queratocitos o fibroblastos estromales y células endoteliales. Debido a la funcionalidad que posee la córnea, los componentes celulares interactúan entre ellos para mantener su integridad y su función mediante una disposición precisa de varios componentes que contribuyen a la transparencia y a la fuerza que posee el tejido corneal.^{9,10}

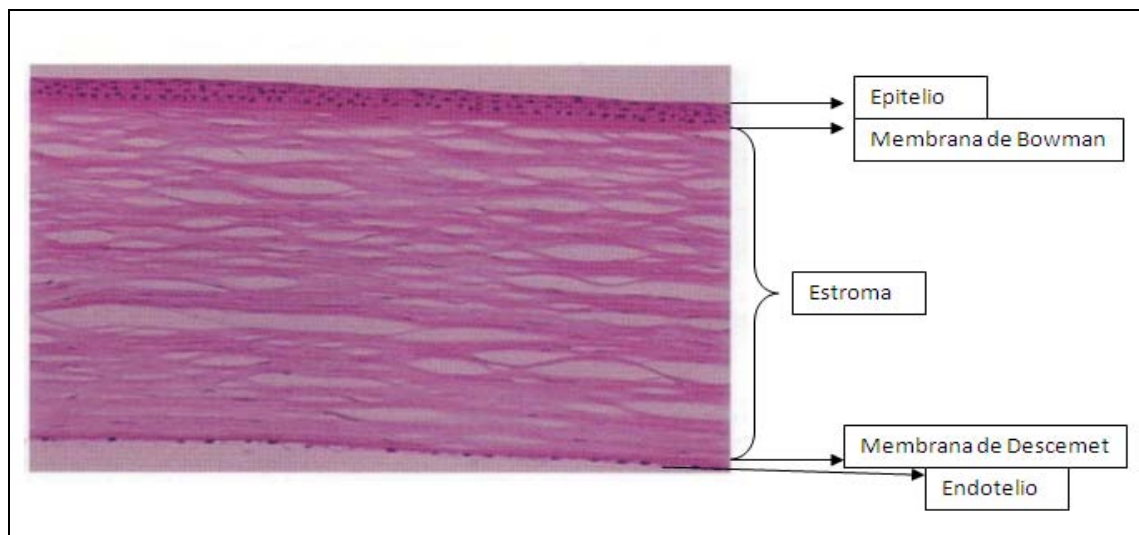


FIGURA 1. Corte histológico de la córnea completa

EPITELIO CORNEAL

Está formado por células epiteliales estratificadas no queratinizadas. Su espesor es aproximadamente de 50 μm , lo que constituye un 10% del espesor total de la córnea. Este epitelio está compuesto de 5 ó 6 capas de células y 3 tipos de células epiteliales distintas: células superficiales, células aladas y células columnares basales.¹¹ Las células columnares basales se encuentran adheridas a la membrana basal subyacente, contigua a la capa de Bowman. Sólo las células basales del epitelio corneal proliferan, las células hijas se diferenciarán en células aladas y, conforme van emergiendo a la superficie, se van diferenciando en células superficiales. Este proceso de diferenciación se lleva a cabo en un período de 7 a 14 días después de los cuales las células superficiales se descaman y se vierten en la película lagrimal.^{1,9,10}

Una de las funciones del epitelio corneal es ser una barrera frente a agresiones externas y esto se consigue mediante unas uniones complejas entre células epiteliales adyacentes. Estas uniones van a prevenir que determinados agentes puedan penetrar en capas más profundas de la córnea. Por tanto, las interacciones célula- célula y célula – matriz, son importantes para el mantenimiento de la estructura normal estratificada y por supuesto para las funciones fisiológicas del epitelio corneal.¹

Las células epiteliales superficiales forman parte del epitelio corneal superficial. Forman 2 o 3 capas celulares, en contraste con lo que sucede en el epitelio de la piel. La superficie de las células está formada por microvellosidades para facilitar a la mucina presente en la lágrima su adherencia a la superficie corneal. Debido a que las células superficiales epiteliales son células ya diferenciadas, no proliferan. La membrana de las células epiteliales está embebida de numerosas moléculas de glicoproteínas y glicolípidos. Estas moléculas forman el glicocalix y confieren propiedades hidrofílicas a la superficie corneal anterior.^{1,9,10}

Las uniones entre las células superficiales del epitelio corneal se producen mediante desmosomas, uniones adherentes y uniones fuertes, que serán las responsables del paso de sustancias hacia el interior de la córnea.

La siguiente capa de células epiteliales que nos encontramos son *las células epiteliales aladas* situadas bajo las células superficiales. Se estructuran en 2 o 3 capas de células. Estas células están en un estado intermedio de diferenciación entre las células basales y las superficiales. Son ricas en tono-filamentos intracelulares compuestos de queratina y su membrana celular está interdigitada para permitir la unión entre ellas mediante uniones complejas (desmosomas, uniones adherentes y uniones gap o en hendidura).^{1,2,9,10,12,13}

La capa más profunda del epitelio que descansa sobre la membrana basal es la capa de *las células epiteliales basales*. Esta capa de células columnares descansa en la membrana basal, tiene una actividad mitótica importante y las células descendientes de las basales epiteliales van a dar lugar a las células aladas y posteriormente a las células superficiales. En esta capa las células basales vecinas están interdigitadas lateralmente, y presentan uniones en hendidura, uniones adherentes y desmosomas. La superficie posterior de las células basales es plana y se apoya sobre la membrana basal. Las células basales están unidas a la membrana basal por hemidesmosomas mediante anclajes de fibras de colágeno tipo VII que secretan las propias células. Las fibrillas de anclaje de colágeno penetran en la membrana basal y cursan dentro del estroma donde forman placas de anclaje junto con el colágeno tipo I, que es el mayor componente del estroma.^{1,2,9,10,12}

MANTENIMIENTO DEL EPITELIO

Las células epiteliales están continuamente renovándose para mantener la estructura en capas del epitelio corneal normal. Son bien conocidos los movimientos centrípetos que se observan en las células epiteliales, así como el hecho de que sólo las células basales epiteliales son capaces de proliferar.¹⁴

Existe un equilibrio entre el movimiento centrípeto de las células epiteliales, la diferenciación en células superficiales epiteliales y la descamación de las células más superficiales: la hipótesis XYZ [X (proliferación de células basales epiteliales) + Y (proliferación de células limbares y migración centrípeta) = Z (pérdida de las células epiteliales superficiales)].^{15,16}

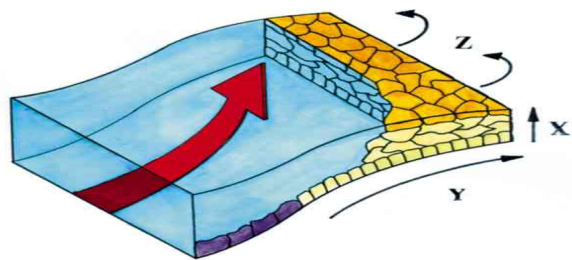


FIGURA 2. Hipótesis xyz. [x (proliferación de células basales epiteliales) + y (proliferación de células limbares y migración centrípeta) = z (pérdida de las células epiteliales superficiales)]

La existencia de las células madre localizadas en el limbo también ha sido bien demostrada. El epitelio limbar exhibe una mayor actividad proliferativa y sus células presentan una diferenciación más baja que las células del epitelio corneal. Las células limbares son un tipo de célula madre indiferenciada porque no expresan la queratina específica del epitelio de la córnea.¹⁴ Por tanto, la reparación de los defectos epiteliales sucede en 3 fases caracterizadas por migración de células epiteliales, proliferación y diferenciación, dando lugar a una restauración de la estructura estratificada del epitelio.

Otro factor importante en la curación de las heridas en el epitelio corneal es el papel fisiológico de la innervación corneal. La pérdida de sensibilidad corneal da lugar a una rotura de la integridad normal de la córnea.^{15,16,17,18} La innervación proviene de la rama oftálmica del nervio trigémino y uno de los neurotransmisores observados en la córnea es la sustancia P, que es la encargada de regular varios procesos fisiológicos, incluyendo la extravasación de plasma, la vasodilatación y la liberación de la histamina de los mastocitos. La denervación del trigémino y como consecuencia, la reducción de la sustancia P en la córnea, da lugar a cambios tróficos en la misma.^{5,19}

LA MEMBRANA BASAL

Como en el epitelio de otras partes del cuerpo, las células basales del epitelio, están ancladas a la membrana basal. Esta membrana basal es producida por las propias células epiteliales y tiene un grosor aproximado de 75 a 100 nm. La presencia de esta membrana entre las células epiteliales basales y el estroma corneal subyacente fija la polaridad de las células epiteliales. Sus componentes principales son colágeno tipo IV, aunque esto es un tema controvertido,^{1,2,13,9,10} laminina, heparina, el proteoglicano perlecano, fibronectina y fibrina. En la zona más anterior, se distingue la lámina lúcida que aparece como una zona de aproximadamente 23nm y electro-lucente mediante microscopía electrónica, mientras que la lámina densa, opuesta a la capa de Bowman, es una región electrodensa, de aproximadamente 48nm de grosor. Existe un tercer componente de la membrana basal que es la lámina reticular. Esta se encuentra inmediatamente por debajo de la lámina densa y está en la capa de Bowman. Esta región contiene las fibras de anclaje, las placas y otros materiales electrodensos asociados a la lámina densa.¹²

LA CAPA DE BOWMAN

La capa de Bowman es visible con microscopía óptica como la interfase entre el epitelio corneal y el estroma. Tiene 12 μm de espesor, está formada de fibras de colágeno y proteoglicanos y su principal función es la de anclaje. Según se ha observado por inmunoelectromicroscopía y microscopía de inmunofluorescencia, está compuesta por colágeno tipo I, III, predominando el tipo I. El colágeno tipo IV y VII están presentes en los complejos de anclaje. Las fibras de colágeno en la capa de Bowman son de colágeno tipo I y tipo III y el diámetro es de 20 a 30 nm, menor al que tienen las fibras de colágeno en el estroma corneal (22.5- 35 nm).^{2,9,10}

La superficie anterior de esta capa está definida por su superficie de contacto con la lámina densa de la lámina basal epitelial. Existen poros que probablemente actúan como canales a través de los cuales los axones de los nervios corneales viajan para llegar al epitelio.^{2,9,10}

En la zona posterior de la capa de Bowman hay haces de fibras de colágeno relativamente grandes que van desde las regiones medias del estroma a terminar en esta capa. Estos haces mantienen una cohesión entre el estroma y la capa de Bowman, de tal forma que dicha capa no se puede separar del estroma como una sábana, como se puede hacer con la de Descemet.^{2,9,10}

Las funciones biológicas atribuidas a la capa de Bowman se han trasladado a la membrana basal y de hecho en muchos mamíferos no hay evidencias de esta capa y sin embargo siguen teniendo una estructura epitelial bien organizada, por lo que el rol fisiológico de la capa de Bowman aún no está claro.^{2,9,10}

ESTROMA CORNEAL:

El estroma corneal constituye la porción mayor de la córnea, más del 90%. Las principales funciones de la córnea, incluyendo su fuerza, su estructura estable y su transparencia, son atribuidas a las propiedades anatómicas y bioquímicas del estroma. La disposición uniforme y la continua producción y degradación de las fibras de colágeno en el estroma son esenciales para mantener la transparencia corneal. Si estudiamos el estroma corneal desecado vemos que está formado por colágeno (68%), queratocitos (10%), proteoglicanos (9%), sales, proteínas y otras sustancias.^{2,20} En la córnea humana el colágeno a nivel del estroma presenta una estructura altamente organizada. Los distintos tipos de colágeno corneales son importantes funcionalmente para establecer la transparencia del tejido y la resistencia tensil. El estroma corneal está compuesto predominantemente de colágeno tipo I, pero también por cantidades menores de colágeno tipo III, V y VI.^{21,10,22,23} También se ha encontrado colágeno tipo XII distribuido periódicamente con las fibras y colágeno XIV.¹³

Aunque el índice refractivo de las fibras de colágeno (1.47) es distinto al de la matriz extrafibrilar (1.35), el tamaño tan uniforme de las mismas y de los espacios entre fibras, junto a la direccionalidad predominantemente paralela de dichas fibras, da como resultado un conjunto de fibras altamente organizado, que permite la transparencia de la córnea debido al fenómeno de la interferencia destructiva.^{22,23}

Este fenómeno está causado porque la distancia entre fibras es menor a la mitad de una longitud de onda del espectro de luz visible. Este anclaje anatómico es el responsable del hecho de que la dispersión de un rayo de luz incidente por cada fibra de colágeno se cancela por la interferencia de otros rayos dispersados por otra fibra. Por

tanto, si el diámetro o la distancia entre fibras de colágeno varían o se convierte en heterogéneo, como sucede en casos de fibrosis o edema, los rayos incidentes serían dispersados de forma aleatoria y la córnea perdería su transparencia.

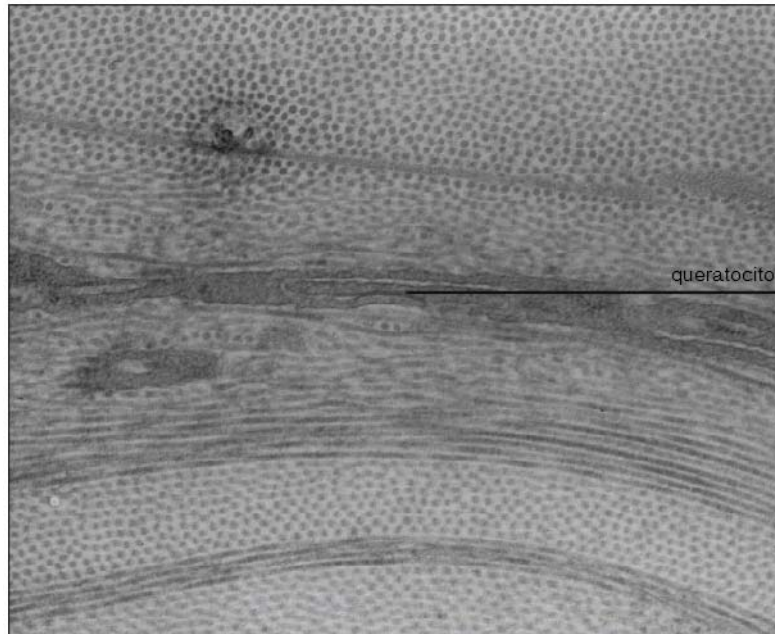


FIGURA 3. Estroma corneal bajo microscopía electrónica. Estructura lamelar y organizada de las fibras de colágeno y uniones gap entre los procesos celulares de los queratocitos en la córnea humana.

COMPONENTES CELULARES DEL ESTROMA

QUERATOCITOS

Los queratocitos son las células predominantes en el estroma corneal y se remplazan cada 2 ó 3 años. Tienen forma de huso y están esparcidos entre las lamelas estromales. Estas células tienen procesos largos y están conectados con las células vecinas mediante uniones gap. Los queratocitos forman una red tridimensional, son similares a los fibroblastos y poseen un citoesqueleto intracelular extenso que incluye prominentes filamentos de actina.¹²

Los queratocitos permanecen en un estado quiescente en la córnea normal pero se activan rápidamente en respuesta a varios tipos de insultos al estroma transformándose en miofibroblastos. Los miofibroblastos reparan el tejido estromal mediante la producción de matriz extracelular, enzimas que degradan el colágeno, metaloproteinasas y citoquinas. Por tanto su acción contribuye a cerrar la herida.¹²

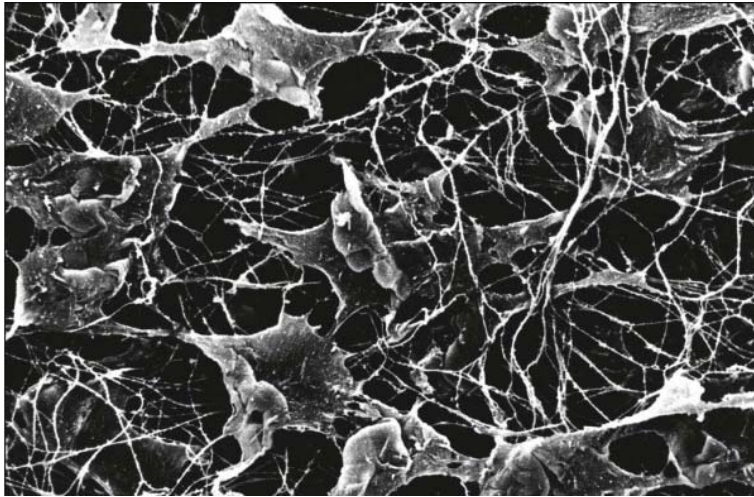


FIGURA 4. Vista tridimensional de los queratocitos de la córnea de una rata después de eliminar el colágeno. Se puede apreciar la red que forman los queratocitos.

En respuesta a un daño agudo, los queratocitos entran en mitosis, adoptan un fenotipo fibroblástico y se mueven al área dañada.²⁴ Esta respuesta está regulada por el factor de crecimiento β (TGF β) y la activación hacia fibroblastos da como resultado el depósito de nueva matriz extracelular con una composición y unas propiedades de transmisión de la luz diferentes de las del estroma normal.²⁵ El diámetro medio de las fibras de colágeno y la distancia media entre fibras en el estroma corneal es homogéneo y es menor que la mitad de la longitud de onda del espectro de luz visible (400 -700nm).²⁶

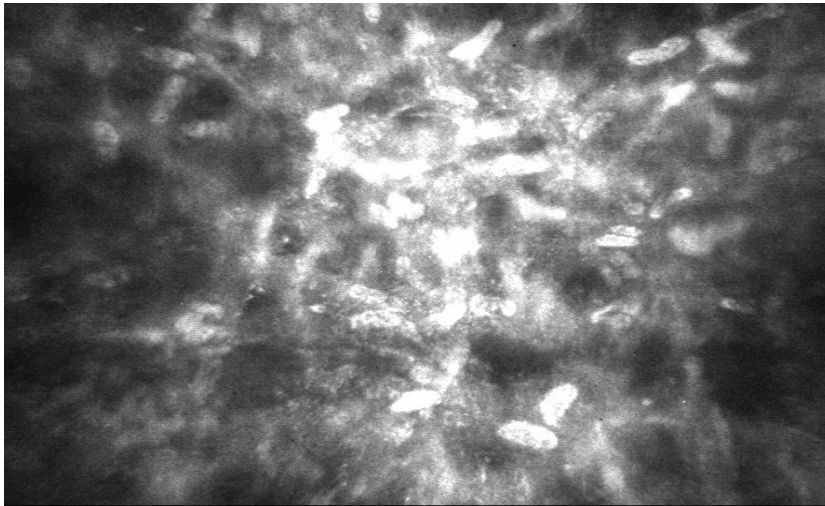


FIGURA 5. Imagen mediante microscopía confocal de *haze* en una córnea humana in-vivo.

COLÁGENO

El colágeno en el estroma es principalmente de tipo I con pequeñas cantidades de tipo III, V y VI.²⁶

Los queratocitos se encargan de segregar las moléculas de pro-colágeno dentro del espacio extracelular. Después de esto los pro-péptidos situados en ambas terminaciones se unen para dar paso a las moléculas de colágeno maduro. Las moléculas de colágeno se unen formando fibrillas que posteriormente formarán las fibras de colágeno.²⁶

PROTEOGLICANOS

Los proteoglicanos están distribuidos entre las fibras de colágeno del estroma corneal. Están compuestos por una proteína central y cadenas de glicosaminoglicanos y se encargan de modular la fibrinogénesis del colágeno. Los glicosaminoglicanos por ellos mismos también presentan un papel importante independientemente del núcleo proteico al cual están adheridos. Por tanto los proteoglicanos pueden considerarse desde el punto de vista del núcleo proteico que poseen o de las cadenas de glicosaminoglicanos que lo forman.^{26, 12}

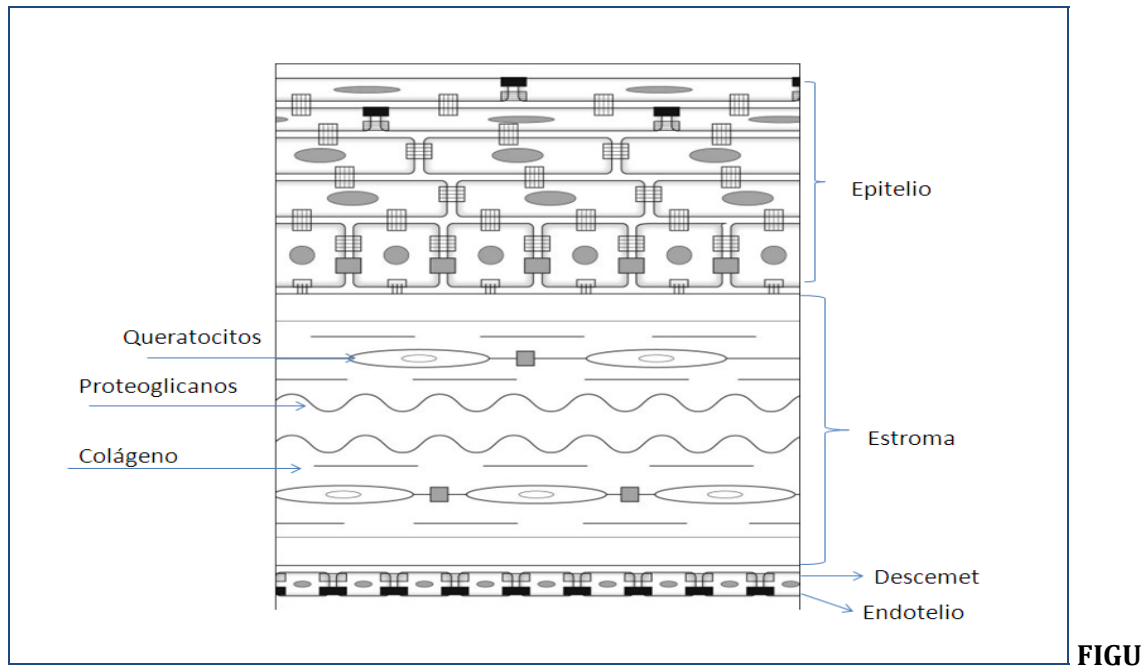
El glicosaminoglicano más abundante en la córnea es el queratán sulfato. El resto son sulfato de condroitina y el dermatán sulfato. La función de los glicosaminoglicanos es absorber y mantener grandes cantidades de agua.²⁶

Las proteínas que componen el núcleo proteico del estroma corneal son lumican, keratocan, mimecan y decorin. El papel de los proteoglicanos aún no está claro pero sus funciones principales parecen ser mantener la transparencia corneal, la forma en condiciones fisiológicas y son los responsables de la turbidez que aparece en condiciones patológicas.²⁶

El agua, el colágeno, los proteoglicanos y los queratocitos trabajan juntos para establecer y mantener la córnea transparente, creando una estructura dura y resistente que mantiene intacta la integridad ocular.²⁶

En el estroma también encontramos células del sistema inmunitario cuyo número se incrementa ante una agresión a la córnea.¹²

Hay que tener en cuenta que la mayoría de células en el estroma son queratocitos encargados de mantener el estroma corneal sintetizando y secretando colágeno tipo I, III, V, VI, XII, XIV, queratán sulfato, dermatán sulfato y metaloproteinasas, aumentando su densidad en respuesta a un daño y migrando hacia la zona dañada.²⁶



FIGU

RA 6. Esquema de la distribución celular en la córnea

PROPIEDADES Y MANTENIMIENTO DE ESTROMA

ELASTICIDAD Y VISCOSIDAD DEL ESTROMA

Una propiedad del colágeno es que al ser un material viscoelástico tiene propiedades de elasticidad y de viscosidad. La elasticidad se refiere a la forma en que un material se deforma en respuesta a una fuerza externa. Un material elástico es aquel que vuelve a su forma original una vez cesa la fuerza externa, en una dirección de desplazamiento reversible a través del camino fuerza-deformación. Los materiales viscosos por su parte, fluyen cuando se les aplica una fuerza externa y de manera distinta a los elásticos, no vuelven a su forma original cuando esta fuerza desaparece.^{27,28}

El módulo de elasticidad o módulo de *Young* [que es una medida de la rigidez intrínseca de un material definido como la proporción de presión (la fuerza que actúa en un objeto por unidad de área debido a una fuerza aplicada externamente) dividido entre la deformación (desplazamiento del material por unidad de longitud)], se determina

midiendo la pendiente de una zona representativa de la gráfica.^{27,28} Los tejidos biológicos presentan típicamente una respuesta viscoelástica, es decir, el módulo de *Young* aumenta según aumenta la fuerza,²⁹ y hay diversos estudios publicados en los que los resultados del módulo de *Young* corneal varían ampliamente desde 0.01 hasta 57 MPa. Sin embargo el módulo de elasticidad de la córnea varía direccional y regionalmente, y presentan un módulo más alto las áreas situadas meridionalmente a las zonas central, paracentral y circunferencial al limbo, debido a la disposición de las fibras de colágeno.²⁹

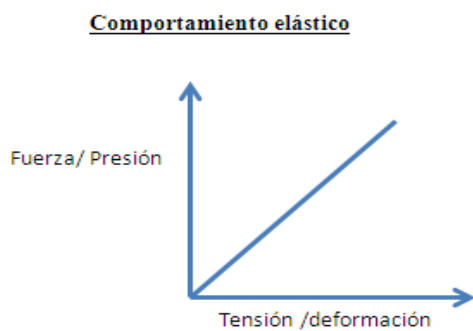


FIGURA 7. Esquema del comportamiento elástico.

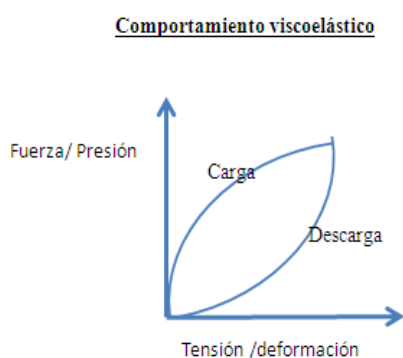


FIGURA 8. Esquema del comportamiento viscoelástico

MANTENIMIENTO DEL ESTROMA

La homeostasis bioquímica y estructural de la matriz extracelular en el estroma corneal se mantiene por un equilibrio entre la síntesis realizada por los queratocitos y una degradación de los componentes de la matriz extracelular. En respuesta a un daño corneal, los queratocitos se diferencian en fibroblastos y activamente producen componentes de la matriz extracelular para la curación del estroma dañado. Cada macromolécula juega un papel importante en el proceso de cicatrización tisular.^{22,24,25,31,32}

Los queratocitos y las células inmunitarias que infiltran el tejido (linfocitos, neutrófilos y macrófagos) secretan citoquinas y factores de crecimiento además de modular los comportamientos de las células del estroma corneal durante el proceso de curación. Cada citoquina o factor de crecimiento activa una vía mediante una transducción de señales, que va a regular la expresión de genes específicos que contribuyen a la respuesta inflamatoria.

El TGF β es un potente estimulador de la formación de tejido conectivo durante el proceso de cicatrización tisular. Lo producen las células epiteliales y estromales (queratocitos) así como las células inflamatorias. En el epitelio, el TGF β estimula la proliferación y migración celular. En el estroma el TGF β activa a las células estromales induciendo una transformación fenotípica de los queratocitos hacia miofibroblastos.²⁵

La función de los miofibroblastos en el proceso de cicatrización es formar una matriz con una composición algo distinta a la de la córnea virgen y con una disposición alterada de las fibras de colágeno, lo que disminuye su transparencia.²⁴ Esta transparencia corneal también puede verse comprometida por otro factor como es la neovascularización. Las citoquinas y los factores de crecimiento liberados por las

células inflamatorias en respuesta a una lesión del estroma corneal, tales como el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) y el TGF β , son los responsables, una vez más, del desarrollo de la neovascularización corneal.¹

INTERACCIÓN EPITELIO-ESTROMA

La interacción que se produce entre el epitelio y el estroma juega un papel importantísimo en los mecanismos de regeneración estromal, ya que las células epiteliales ante una lesión responden con la liberación de citoquinas y factores de crecimiento que, como hemos visto previamente, van a estimular a los queratocitos estromales para que se transformen en fibroblastos y miofibroblastos y posteriormente secreten la matriz extracelular. Esta respuesta se observa por ejemplo, después de la aplicación del láser excímer, especialmente en la cirugía de ablación de superficie como la queratectomía fotorrefractiva (PRK),¹ pero también tras la creación de un lentículo o flap (a partir de ahora nos referiremos a los lentículos como flaps por ser el término más usado en cirugía refractiva) durante la cirugía de LASIK. También se puede observar en otras cirugías refractivas, como tras la creación de los túneles estromales para la inserción de anillos intraestromales para casos de ectasia corneal.¹

Las citoquinas liberadas ante un trauma o agresión en el epitelio, actúan sobre los queratocitos provocando su apoptosis.¹⁴³ Secundariamente, provocan una proliferación y migración de queratocitos para repoblar la zona dañada con aparición de queratocitos activados e infiltración por células inflamatorias.^{143,155,156,157} Posteriormente, factores de crecimiento (especialmente el TGF β) y determinados mediadores inducen la diferenciación de los queratocitos hacia miofibroblastos^{141,158,159} y estos están implicados en la remodelación del tejido corneal a través de la producción tanto de colágeno y matriz extracelular como de colagenasas, gelatinasas y metaloproteinasas,^{140,160} y en la aparición de haze, debido a la mayor dispersión de la luz que generan tanto

su núcleo como su cuerpo celular y sus prolongaciones, a diferencia de los queratocitos quiescentes.^{142,145}

Una vez cerrada la lesión epitelial, la cascada inflamatoria desaparece y el número de miofibroblastos va disminuyendo progresivamente. Por otro lado, una vez que la membrana basal se ha restaurado la diferenciación estromal es hacia queratocitos en vez de hacia miofibroblastos.¹⁵⁷

LA MEMBRANA DE DESCOMET

La membrana de Descemet es la membrana basal del endotelio y aumenta su espesor desde el nacimiento (3 μm) hasta la edad adulta, (8 - 10 μm en humanos).³³ El análisis histológico de esta membrana muestra que se encuentra estratificada en una fina capa de unas 0,3 μm adyacente al estroma no adherida, una zona anterior adherida al estroma (de 2 a 4 μm) y una zona amorfa posterior no adherida (mayor de 4 μm), esta última es depuesta por el endotelio a lo largo de la vida. No existen hemidesmosomas u otras uniones de anclaje entre la membrana de Descemet y el endotelio.¹

Al encontrarse localizada entre el endotelio y el estroma, cualquier intercambio de sustancias entre éste y el humor acuoso tiene que atravesar tanto la membrana de Descemet como el endotelio. El endotelio representa una barrera débil, bastante permeable, permitiendo el paso de iones y agua desde el humor acuoso al estroma, y el intercambio entre el humor acuoso y el estroma no parece encontrarse afectado por la membrana de Descemet.^{35,36}

ENDOTELIO

El endotelio es una capa simple de células, de 400.000 a 500.000 células endoteliales, derivadas de la cresta neural que cubren la superficie posterior de la membrana de Descemet en forma de mosaico bien organizado. Las células son uniformes, tienen un espesor de 5 μm y un ancho de 20 μm , son poligonales, de forma hexagonal en su mayoría¹³ y están directamente en contacto con el humor acuoso de la cámara anterior.^{1,12}

La densidad celular endotelial va disminuyendo con la edad, desde el nacimiento (5000 cel/mm²) hasta la edad adulta (3500 cel/mm² en un adulto).^{1,12}

Las células endoteliales son metabólicamente activas ya que contienen núcleos grandes con abundantes orgánulos citoplasmáticos, mitocondrias, retículo endoplasmático, y aparato de Golgi.¹³

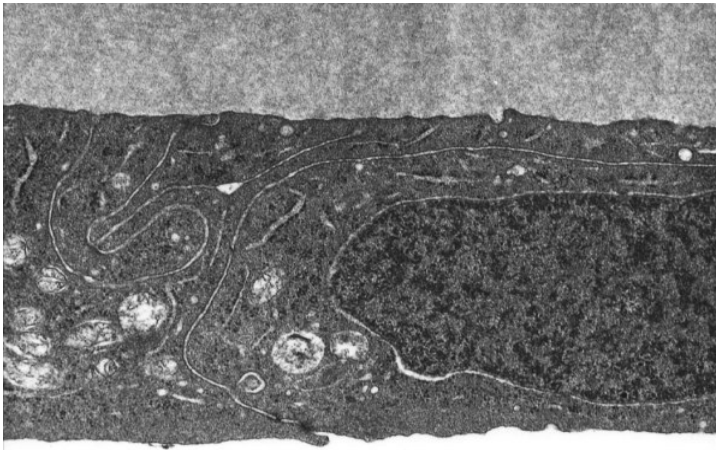


FIGURA 9. Imagen de una célula endotelial bajo microscopía electrónica. Se pueden apreciar los orgánulos citoplasmáticos (mitocondria, retículo endoplasmático, ribosomas y aparato de Golgi).

El daño endotelial se repara por la migración y la ampliación de las células endoteliales restantes. El coeficiente de variación del tamaño celular proporcionado por el microscopio especular (Coeficiente de variación = la desviación estándar de la

superficie celular media / superficie celular media) cuyo valor en una córnea normal es de 0.25, es el índice más sensible de la disfunción endotelial. El incremento de este valor implica una variación en el tamaño de las células y se denomina polimegatismo.¹²

Otro parámetro morfométrico del estado del endotelio es la hexagonalidad, que en este caso nos va proporcionar información sobre el proceso de reparación de la herida endotelial. En una córnea sana alrededor del 70- 80% de células son hexagonales. Sin embargo un daño endotelial puede dar como resultado una disminución del valor de hexagonalidad, a lo que se denomina pleomorfismo.¹²

MANTENIMIENTO DEL ENDOTELIO CORNEAL

El mantenimiento del endotelio corneal es crucial, ya que el daño endotelial da lugar a edema corneal, por lo que un índice indirecto de la función biológica global del endotelio será el espesor corneal.^{20,37,38} El endotelio tiene una importancia fundamental en la prevención de la edematización estromal, siendo esta su principal función.²⁰

Una vez descrito el funcionamiento de la córnea en estado normal vamos a describir cuales son las principales técnicas de cirugía refractiva y cuál va a ser el efecto en la córnea normal de cada una de ellas, así como la importancia de conocer éste proceso de curación y sus consecuencias a largo plazo.

1.3 INTRODUCCIÓN A LA CIRUGÍA REFRACTIVA

La córnea, en concreto la interfase aire-película lagrimal, es la responsable del 60 al 70% del poder dióptrico del ojo; el resto lo determina el cristalino.³⁹ A la cirugía que va dirigida a alterar el poder dióptrico del ojo se la considera cirugía refractiva, bien intraocular mediante la sustitución del cristalino por otra lente de distinta potencia o añadiendo una lente adicional sin eliminar el cristalino, bien extraocular actuando directamente en la córnea. La cirugía refractiva corneal va dirigida a modificar el poder

dióptrico de la córnea: si se quiere una corrección de la miopía, la córnea debe ser aplanada, para aumentar el radio de curvatura y así disminuir el valor dióptrico de la misma. Si lo que se quiere corregir es la hipermetropía, hay que disminuir el radio de curvatura de la córnea para aumentar su potencia.

En cirugía refractiva distinguimos los procedimientos sustractivos o aditivos y los procedimientos no sustractivos ni aditivos. Como ejemplos de cirugía refractiva sustractiva tenemos la queratomileusis y la queratectomía automatizada lamelar (ALK); como ejemplo de cirugía aditiva nos encontramos con la epikeratofakia y con los implantes intracorneales.³⁹

Entre los procedimientos de cirugía refractiva no sustractiva ni aditiva tenemos la cirugía incisional. Dentro de la cirugía incisional encontramos la queratotomía radial (RK), cuyo objetivo es debilitar la córnea periférica a través de incisiones radiales de un 85%-95% de profundidad dejando una zona central libre para provocar el aplanamiento de la córnea central^{40,41} y conseguir así una disminución de la miopía. Otro tipo de cirugía incisional es la queratotomía astigmática (AK), en la que se realizan incisiones perpendiculares al eje más curvo para conseguir aplanar dicho eje.^{42,43} Actualmente esta AK se practica para disminuir el astigmatismo preoperatorio en cirugía de catarata⁴⁴. En pacientes que buscan eliminar su defecto refractivo y no presentan catarata, el láser excimer ofrece mayor predictibilidad que la AK.⁴⁵

Otras técnicas de cirugía refractiva no sustractiva ni aditiva son las técnicas de cirugía térmica como la termoqueratoplastia láser^{46,47} y la queratoplastia conductiva, que permiten la corrección de baja hipermetropía. Ambas técnicas se basan en la aplicación de calor en la periferia corneal provocando una contracción del tejido subyacente con el consiguiente encurvamiento central y aplanamiento periférico.⁴⁸ La

tendencia a la regresión y el rango de predictibilidad de estas últimas técnicas están por resolver aún.^{49,50}

EVOLUCIÓN DE LA CIRUGÍA REFRACTIVA

Ignacio Barraquer está considerado el creador de la cirugía refractiva corneal. Barraquer descubrió y desarrolló muchas de las técnicas que permiten la práctica de la cirugía actual. Publicó la clave en la que indicaba que la alteración de la córnea por adición o sustracción de tejido puede alterar el poder refractivo de la córnea. La primera técnica de cirugía refractiva con sustracción de tejido la llamó queratomileusis,^{51,52} consistente en realizar una queratectomía lamelar con un microqueratomo para obtener un lentículo completo. El lentículo se congelaba y se colocaba en un torno para eliminar tejido corneal central (para corregir miopía) o periférico (para hipermetropía). La laminilla corneal tallada se recolocaba entonces sobre la córnea y se suturaba. Los problemas asociados a esta técnica residían en parte en el diseño de los microqueratomos, menos seguros que los actuales, que conllevaban riesgo de pérdida de succión con formación de lentículo irregular o incompleto, lentículo excesivamente fino, penetración en cámara anterior, resección descentrada o pérdida del flap.^{53,54}

Otra técnica que se desarrolló fue la epiqueratofaquia.^{54, 55} Se basaba en tallar un flap de un donante para darle el poder dióptrico necesario y después se suturaba éste a la córnea previamente desepitelizada de un receptor. Las complicaciones de esta técnica fueron fundamentalmente debidas a la dificultad en la reepitelización del injerto, y a la incidencia altísima de infección y necrosis del lentículo. Además, los resultados refractivos eran muy variables e incluso algunos pacientes llegaron a perder agudeza visual mejor corregida (AVcc). Por todo lo mencionado, la técnica de epiqueratofaquia se abandonó.⁵⁶

Para evitar las dificultades que surgieron al tallar el flap, apareció la ALK. Esta técnica estaba dividida en dos pasos: un primer paso consistía en realizar un corte con un microqueratomo para levantar un flap corneal no completo ya que permanecía unido a la córnea por una bisagra, y un segundo paso del microqueratomo eliminaba un lenticulo del lecho estromal con la intención de aplanar la córnea central y corregir la miopía. El flap creado en el primer paso se colocaba de nuevo sobre el lecho estromal.⁵⁷

Cuando apareció el láser excimer esta técnica se abandonó ya que los resultados eran poco precisos al compararlos con los que se conseguían con el láser excimer.⁵⁸ De hecho, el avance más importante en la cirugía refractiva ha sido la aparición del láser excimer para la ablación corneal refractiva. El nombre de laser excimer proviene de “*excited dimer*” laser: es un láser de fluoruro de argón que, aplicado a la longitud de onda de 193 nm (dentro del rango de la radiación ultravioleta), libera fotones de alta energía que provocan rotura de las uniones moleculares de la superficie ablacionada.^{59,60} Las moléculas liberadas son expelidas a alta velocidad,⁶¹ sin que se produzca disrupción del tejido circundante ni daño térmico tisular.⁶² La posibilidad de eliminar la cantidad de tejido corneal necesaria y con el patrón de ablación adecuado permite tratar distintos defectos refractivos. Teniendo en cuenta el efecto que produce el láser en el tejido corneal, la miopía se trata ablacionando tejido del centro corneal; la hipermetropía, aplicando la ablación como un anillo en la periferia media corneal y el astigmatismo, eliminando un cilindro de tejido en el eje adecuado.

El tallado de la superficie corneal puede realizarse por distintos métodos. Cronológicamente, el primer láser que se desarrolló fue el láser de haz ancho,³⁹ en el que el área de láser que incide en la córnea está determinada por la apertura de un diafragma a través de la cual pasa el haz de láser, incidiendo simultáneamente en la córnea en toda el área tratada. Las principales complicaciones de este tipo de aplicación

del láser son: por un lado, la dificultad de corregir defectos refractivos complejos; por otro, la posibilidad de que mínimas irregularidades en la energía del frente del láser queden impresas en la superficie corneal, provocando astigmatismo irregular. Uno de los patrones que aparecían con estos láseres eran las islas centrales, áreas de mayor potencia dióptrica en el centro corneal tras una ablación miópica con haz ancho.^{63,64}

Para evitar estas islas se realizó un ajuste a sus perfiles de ablación, con un pretratamiento sobre la zona central, con el inconveniente de aumentar la profundidad de ablación requerida para un determinado defecto refractivo.⁶⁵

El segundo método de liberación del láser excimer son los láseres de barrido.³⁹ Éstos aplican el haz de láser en forma de pequeña hendidura que, barriendo la superficie de la córnea y modificando su longitud y su orientación, consigue ablaciones más regulares y de defectos refractivos más complejos. Una variación de los láseres de barrido son los que utilizan el llamado “punto volante”. En lugar de una hendidura móvil, el láser se aplica en forma de un haz de pequeño diámetro (de 0.7 mm a 2 mm) que se mueve rápidamente sobre la córnea según un patrón predeterminado o semialeatorizado, dirigido por computadora gracias a unos espejos galvanométricos. La ventaja de estos láseres de barrido con punto volante es su mayor flexibilidad para tallar distintos patrones de ablación,⁶⁶ lo que ha permitido la introducción de ablaciones esféricas, que tratan de mantener la prolapicidad fisiológica de la córnea para conseguir una mejor calidad visual postoperatoria, y de ablaciones guiadas por aberrometría.⁵⁹ Por tanto, complicaciones que existían con el láser de haz ancho, como las islas centrales, se evitan, consiguiendo una topografía postoperatoria más regular, con mayor zona óptica efectiva y con un cambio en la curvatura corneal más progresivo.⁶⁷ Con los láseres de barrido debe haber un alineamiento perfecto de la córnea. Debido a los sistemas de rastreo ocular (“eye tracking”) incorporados se permite seguir los movimientos oculares

y desplazar así el impacto en microsegundos y de esta forma se evita el perfil de ablación irregular.^{68,69}

Las primeras técnicas en las que se aplicó el láser excimer fueron en las ablaciones de superficie.

QUERATECTOMÍA FOTORREFRACTIVA

Inicialmente, el láser excimer se usó directamente sobre la superficie corneal, eliminando previamente el epitelio. Esta técnica es conocida como PRK. El epitelio se elimina mecánicamente bien mediante raspado, bien con el láser. En este caso la técnica se llama PRK transepitelial. El láser excimer se aplica sobre la capa de Bowman para que ablacione el estroma anterior. La capa de Bowman desaparece y el área ablacionada se deja al desnudo para que reepitelice.⁷⁰

QUERATECTOMÍA SUBEPITELIAL ASISTIDA POR LÁSER EXCIMER (LASEK)

La técnica LASEK consiste en desepitelizar la superficie corneal manteniendo un flap epitelial íntegro, que posteriormente a la ablación se puede recolocar.⁷¹ Azar en 1996⁷² realizó la primera ablación de superficie con recolocación del epitelio, pero fue Camellin quien denominó a la técnica de la forma que se usa en la actualidad, “laser-assisted subepithelial keratectomy” (LASEK), ya que también recibe nombres como ablación subepitelial con láser excimer (ELSA), “laser subepithelial keratomileusis”, “laser epithelial keratomileusis”, “epithelial flap photorefractive keratectomy”, “subepithelial photorefractive keratectomy”.^{71,73,74}

La desepitelización se realiza con una dilución de etanol al 18-20% que se deja en contacto con el epitelio durante 20-40 segundos. Con esto se consigue la separación del epitelio con su membrana basal de la capa de Bowman subyacente con ayuda de un marcador centrado en pupila. La función del alcohol sobre la fisiología corneal es

romper los anclajes que en la primera parte de la introducción hemos descrito que existen entre el epitelio y su membrana basal. Con la ayuda de una cuchilla se separa el borde del flap epitelial demarcado, se repliega la capa epitelial dejándola unida por una bisagra en superior o en temporal. Posteriormente se realiza la ablación con el láser sobre la capa de Bowman y el estroma anterior. Una vez finalizada la ablación, se irriga el lecho estromal y se recoloca el flap epitelial cubriendo el área ablacionada por completo.⁷²

QUERATOMILEUSIS IN SITU CON LÁSER EXCIMER (LASIK)

Una de las técnicas más habituales en cirugía refractiva corneal es la técnica LASIK. Esta técnica consiste en realizar un corte lamelar corneal para separar un flap estromal, bien con un microqueratomo mecánico (MK), técnica a la vamos a nombrar MK LASIK, bien con un láser de femtosegundo (FS), a la que haremos referencia como FS LASIK. Posteriormente al corte lamelar se ablaciona el lecho estromal para corregir el error refractivo usando un láser excimer. Al final se recoloca el flap estromal sobre el área ablacionada.^{75,76}

El constante desarrollo de los microqueratomos se debe a que el principal problema o complicación de esta técnica quirúrgica puede derivarse de la creación del flap. Las complicaciones más importantes son: perforación del flap (button hole), formación incompleta del flap, corte completo del flap, etc... Afortunadamente la perforación corneal durante la formación del flap se ha abolido debido a la creación de microqueratomos de última generación.⁷⁷

MICROQUERATOMOS

Actualmente existen varios métodos para crear el flap en la cirugía LASIK, desde MK automáticos de acero, hasta MK con motor de agua y láser de FS. Los atributos deseables de cualquier MK son: espesor del flap controlado, complicaciones mínimas al realizar el flap y diámetro de flap adecuado para permitir la ablación deseada.⁷⁷ Los MK automáticos de cuchilla de acero incluyen de forma general un motor, la cabeza del microqueratomo, unas lentes aplanadoras, anillos de fijación de vacío de varios diámetros y profundidades. Actualmente existen 5 tipos de MK: no desechable de motor horizontal, no desechable de motor vertical y desechable de motor de agua y el láser femtosegundo.⁷⁷

LASIK CON LÁSER DE FEMTOSEGUNDO

La introducción del láser femtosegundo se debió a la necesidad de disminuir los riesgos asociados al corte de los microqueratomos mecánicos, y a la investigación de métodos de corte lamelar distintos.^{78,77} La seguridad de los microqueratomos mecánicos ha aumentado notablemente a lo largo de los años, pero las complicaciones siguen presentándose sobre todo en pacientes con córneas finas, planas o demasiado curvas.^{79,80}

LÁSER FEMTOSEGUNDO

Actualmente, hay 5 láseres femtosegundo comercialmente disponibles: IntraLase (Abbot Medical Optics Inc, Santa Ana, California), Femtec (20/10 perfect Vision, Heidelberg, Germany), Femto LDV (Ziemer Ophthalmic Systems, Port, Switzerland), VisuMax (Carl Zeiss Meditec AG, Jena, Germany) y WaveLight FS200 (Alcon Laboratories Inc, Ft worth, Texas). El láser femtosegundo administra pulsos ultracortos de una duración de 10^{-15} seg. Su longitud de onda se sitúa en el infrarrojo (alrededor de los 1.000 nm). Como la córnea es transparente a los infrarrojos, no absorbe la energía

del láser femtosegundo, a diferencia de la energía que proporciona el láser excimer. La principal característica del láser de femtosegundo es que puede obtenerse una gran potencia con pulsos de baja energía (de hasta 1020 C/cm^2 , en comparación con los 300 mW/mm^2 del láser argón verde).⁸¹

El primer sistema de laser femtosegundo para uso en cirugía refractiva fue el IntraLase (Abbot Medical Optics Inc, Santa Ana, California). Este láser de femtosegundo emplea un láser de estado sólido con una longitud de onda de 1053 nm y $3 \text{ }\mu\text{m}$ de tamaño de spot, utiliza pulsos de láser de femtosegundo para causar una interrupción en un plano lamelar. La posición de la bisagra, el diámetro y el grosor del colgajo se pueden ajustar según las especificaciones exactas del cirujano.^{81,82,83}

La energía del láser en el IntraLase se crea por medio de un sistema de Nd: cristal (matriz de amplificación de cristal mezclada con neodimio) que emite a 1053 nm . La emisión de pulsos de baja energía necesita un amplificador de pulsos situado después del generador. El sistema de emisión, compuesto por dos galvanómetros perpendiculares (espejos rotatorios) permite la emisión tridimensional del láser. El haz se enfoca a la profundidad corneal deseada por medio de una lente convergente esférica. La frecuencia de los impactos es de 15000 Hz , 30000 Hz , 60000 Hz o 150000 Hz y cada impacto dura alrededor de $600 \text{ femtosegundos}$. La energía de los pulsos empleados para la creación del colgajo corneal es de $1,5\text{-}2,0 \text{ microJ}$.⁸¹

La forma de actuación en la córnea del láser femtosegundo en general es mediante un fenómeno de disrupción molecular debido a la ionización atómica. El haz debe enfocarse en un punto lo suficientemente pequeño para alcanzar el umbral de fluencia requerido (energía por unidad de superficie). La ionización que acontece durante los pulsos ultracortos se provoca por absorción mutifotónica, es decir, por la absorción simultánea de varios fotones por un solo electrón de un átomo, lo que

confiere la energía suficiente para liberar el electrón. El fenómeno no es lineal, sino que varía exponencialmente con el número de fotones absorbido. El electrón liberado a su vez genera otros electrones libres por colisión en un proceso conocido como ionización en avalancha. Con los pulsos ultracortos la energía permanece concentrada próxima al impacto, y la interacción entre el láser y la materia es efímera. La elevada energía de los electrones liberados se transfiere muy rápidamente al medio contiguo. El tejido objetivo es vaporizado directamente y el vapor resultante posee una energía cinética muy elevada, crea una onda acústica característica que disipa la mayor parte de la energía. El volumen de la materia vaporizada (burbuja de cavitación) es pequeño y muy concreto. Cuanto más corto sea el pulso, menor umbral de fluencia, es decir, menor energía por unidad de superficie será necesaria para vaporizar el tejido objetivo. De esta forma se reduce la energía del pulso requerida y también el tamaño de la burbuja de cavitación. Entonces para un diámetro de impacto de 5-10 micras, un pulso que dure 450 femtosegundos con una energía de 7,5 microJ produce burbujas de cavitación de 10 micras de diámetro.^{64,77,78}

Para crear el flap corneal en la cirugía LASIK con el láser de femtosegundo Intralase se utiliza un anillo de succión que va a producir una elevación de la presión intraocular (PIO) de grado leve (30mmHg). Para obtener una queratectomía con superficies paralelas resulta crucial el empleo de un cono que incorpora una lente de aplanación de cristal. La profundidad de la queratectomía oscila entre las 90 y las 400 micras. El diámetro mayor del flap es de 9 mm y la disección lamelar se logra por yuxtaposición de impactos muy pequeños, de alrededor de 3 micras de diámetro. Los impactos se aplican siguiendo un patrón en rejilla (líneas consecutivas de impactos paralelas a la bisagra). Los primeros pulsos se aplican sobre lo que será la bisagra y posteriormente se crea una bolsa que aloja los gases generados durante el tratamiento.

El último paso es la creación de los bordes del flap, pudiendo elegir el cirujano la angulación de los mismos. Ésta angulación del borde va a asegurar una estabilidad excelente cuando se recoloca el flap. Los miles de impactos requeridos para realizar la queratectomía se aplican en 45 segundos aproximadamente. Posteriormente, el colgajo debe levantarse con una espátula roma, empezando en una zona cercana a la bisagra.^{64,77,78}

En resumen, el láser femtosegundo se programa a la profundidad deseada y un pulso de energía se focaliza en un punto preciso dentro de la córnea, vaporizando aproximadamente 1µm de tejido corneal y creando microplasma. Como producto de la fotodisrupción se crea una burbuja de cavitación de gas dióxido de carbono y agua que va a separar las lamelas corneales. Por último el dióxido de carbono y el agua producidos en esta fotodisrupción desaparecen al levantar el flap y mediante la absorción por la bomba endotelial, dejando una zona de escisión en la córnea.^{64,77,78}

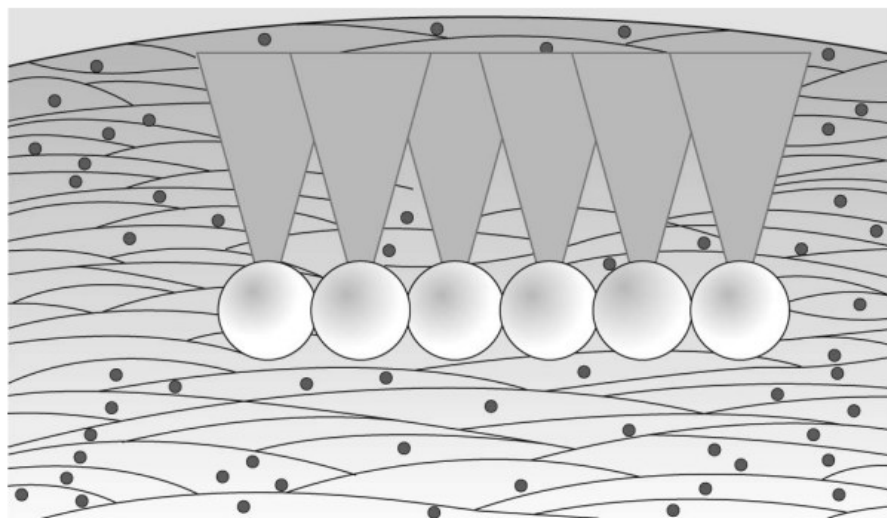


FIGURA 10. Esquema de la actuación del láser femtosegundo en el estroma corneal. Creación de burbujas de cavitación.

El uso del femtosegundo puede ser particularmente beneficioso en pacientes con ojos pequeños, órbitas hundidas anatómicamente, y córneas inusualmente planas ya que parece reducirse la posibilidad de producir un ojal en el flap, o un corte incompleto, así

como un flap descentrado. El láser de femtosegundo consigue cortes más precisos y disminuye el riesgo intraoperatorio de la cirugía LASIK.^{85,86,87} También se pueden crear flaps más finos y puede ser programada la angulación de la periferia del flap, lo que teóricamente da lugar a una mayor estabilidad del flap. Sin embargo, el riesgo de complicaciones postoperatorias asociadas al flap estromal persisten, unidas a nuevas complicaciones propias del láser de femtosegundo como por ejemplo el trastorno transitorio de sensibilidad a la luz.^{88,89,90}

DIFERENCIA ENTRE LÁSERES DE FEMTOSEGUNDO

La tecnología del láser femtosegundo se introdujo por primera vez a finales del 2001 y la evolución tecnológica ha dado lugar a un aumento gradual en su frecuencia de disparo que ha pasado de 6 kHz iniciales a los 500 kHz que existen actualmente.⁹¹

Los láseres femtosegundo disponibles difieren entre sí en la energía del pulso y la frecuencia, la superficie de aplanación (curva o plana), el patrón de aplicación del láser (patrón en rejilla o en espiral) y en la posibilidad de movilidad de los mismos. En la **tabla 1** se exponen las principales diferencias entre ellos.⁹¹

TABLA 1. Principales diferencias en los parámetros de los láseres femtosegundo disponibles comercialmente.

Parámetro	IntraLase	Femto LDV	Zeiss VisuMax	FemTec 2010	WaveLight FS200
<i>Tipo de láser</i>	Amplificador	Oscilador	Fibra óptica amplificador	Amplificador	Oscilador-Amplificador
<i>Longitud de onda</i>	1053	1045	1043	1053	1045
<i>Patrón</i>	Rejilla	Segmentado	Espiral	Espiral	Rejilla
<i>Centrado</i>	Por ordenador	Mecánico	Mecánico	Mecánico	Por ordenador
<i>Visualización de la cirugía</i>	Virtual y visual	Virtual	Visual	Visual	Visual y Visual
<i>Movilidad</i>	No	Si	No	No	No
<i>Superficie de aplanación</i>	Plana	Plana	Curva	Curva	Plana Modificada

1.4 MICROSCOPIA CONFOCAL

Durante los últimos 35 años, las técnicas para examinar la córnea humana en vivo desde el punto de vista global y celular han evolucionado exponencialmente con el desarrollo de la microscopía especular, la topografía corneal computarizada, los ultrasonidos de alta frecuencia y la microscopía confocal in vivo. Aunque la microscopía común y la microscopía electrónica aportan una gran información sobre la córnea normal y anómala, están limitadas por el efecto de la degeneración de los tejidos escindidos y los artefactos de procesamiento. Los métodos no invasivos para el análisis corneal más allá de la lámpara de hendidura, es decir, a nivel celular o microestructural son el punto principal de investigación actual.⁹²

La microscopía confocal in vivo es un método no invasivo para examinar la córnea humana en condiciones sanas y patológicas siendo por tanto una herramienta muy poderosa tanto en clínica como en investigación.⁹²

La microscopía confocal proporciona imágenes de mayor resolución, con un mejor rechazo de la información fuera de foco que la microscopía convencional, y por tanto, la capacidad que tiene el microscopio confocal de realizar secciones ópticas dentro de un tejido grueso de un espécimen elimina la necesidad de procesar y seccionar los tejidos que se quieren evaluar. La microscopía confocal es especialmente útil para el estudio del tejido en sujetos vivos y por eso ha sido utilizada en numerosos estudios de investigación en animales desde su desarrollo, pero en los últimos años, el uso del microscopio confocal en humanos ha aumentado de forma espectacular.⁹²

El diseño óptico del microscopio confocal se basa en el principio de Lukosz, que establece que la resolución puede ser mejorada a expensas de campo de visión.⁹³ Minsky inventó el microscopio confocal en 1955.⁹⁴ El prototipo original se llamó microscopio de exploración de doble etapa. Marvin Minsky desarrolló este microscopio confocal para estudiar las redes neuronales en el cerebro vivo.⁹⁴ El condensador del microscopio desarrollado por Minsky focalizaba la fuente de luz dentro de una pequeña área del tejido examinado haciendo coincidir el enfoque de la lente objetivo del microscopio en la misma zona. Debido a que el condensador y las lentes del objetivo tenían el mismo punto focal, el microscopio que se denominó "confocal".⁹⁴

Petran y colaboradores posteriormente desarrollaron el primer microscopio de barrido en tándem (MCBT) en 1968.⁹⁴ Con este diseño, el campo de visión se conseguía por el escaneado simultáneo de múltiples puntos de exploración en un espécimen estacionario utilizando un disco giratorio Nipkow. Este microscopio se utilizó para observar imágenes del cerebro y de las células ganglionares de salamandras y ranas.⁹⁶ Egger y Petran obtuvieron las primeras imágenes de células cerebrales y otros órganos, sin escindirlos y sin usar tinciones.^{95,96} Estas observaciones iniciales no se repitieron hasta 1985, cuando Boyde demostró la habilidad que poseía el MCBT para hacer secciones histológicas de los osteocitos en un hueso intacto sin usar técnicas de procesamiento destructivas como pueden ser la desmineralización o moler el hueso.^{97,98} Sin embargo, hasta casi 20 años después no se usó el MCBT para la observación del tejido ocular.

En 1985 Lemp y colaboradores obtuvieron la primera imagen completa del espesor de la córnea de conejos in situ.⁹⁹ Una versión clínica de este microscopio original fue producido por la Corporación Tandem Scanning (Reston, VA, EE.UU.). Posteriormente

la desarrolló Avanced Scanning Corporation (Nueva Orleans, EE.UU.) pero ya no se produce. En paralelo con el desarrollo del MCBT se desarrolló el microscopio confocal de barrido en hendidura (MCBH) cuyos principios ópticos veremos posteriormente.¹⁰⁰

En 1969, Svishchev fabricó el microscopio confocal de escaneo a doble cara.¹⁰¹ Este diseño fue posteriormente modificado por Thaeer para permitir análisis en tiempo real. Actualmente hay varios MCBH, como por ejemplo el CONFOSCAN P4 (Tomey Corporation, Cambridge, MA, EE.UU.), CONFOSCAN 4 (Tecnologías de Nidek, Gamagori, Japón) y Microphthal (Helmut Hund, Wetzlar, Alemania).¹⁰¹

El dispositivo más recientemente desarrollado es el que usa luz coherente para producir escaneados láser in vivo: el Heidelberg Retina Tomograph (HRT) II y III junto con el Módulo de córnea Rostock (MCR) (Heidelberg Engineering, GmbH, Alemania).

PRINCIPIOS ÓPTICOS DE LA MICROSCOPIA CONFOCAL

Todos los diseños de microscopía confocal utilizan el mismo principio básico en su diseño, permitiendo secciones ópticas de un espesor relativo mediante la dispersión de la luz del objeto. La luz pasa a través de una abertura y esta se enfoca mediante una lente objetivo en una pequeña área de la muestra. A continuación, la luz reflejada desde el espécimen pasa a través de una segunda lente objetivo. Esta luz se enfoca sobre una segunda abertura que está dispuesta de tal forma que la luz fuera de foco se elimina.¹⁰² Debido a que los caminos de iluminación y de detección comparten el mismo plano focal, se utiliza el término "confocal". La capacidad de este sistema para discriminar la luz que no está en el plano focal hace que las resoluciones axial y lateral sean comparables con la microscopía convencional aunque este sistema está limitado debido al pequeño campo de visión que posee. Pero es posible obtener un mayor campo visual escaneando la muestra, es decir, bien moviendo la muestra mientras que el microscopio está estático, o moviendo el microscopio confocal mientras la muestra está estática.¹⁰³

Los dispositivos de microscopía confocal actual utilizan la última técnica, el microscopio confocal se mueve mientras el espécimen está estático.

En última instancia, la velocidad a la que se adquiere una sola imagen del microscopio se denomina resolución temporal del microscopio. Esto es importante porque una resolución temporal pobre está asociada con un aumento de artefactos debidos al movimiento cuando se examinan sujetos humanos vivos, en los que los movimientos involuntarios son inevitables, debido al pulso, la respiración o el movimiento del ojo.¹⁰³

Finalmente, las señales producidas por la luz reflejada en los microscopios confocales in vivo se recogen mediante detectores electrónicos (por ejemplo cámaras) sobre la base de un dispositivo de carga acoplada. Las capturas de vídeo y / o sistemas digitales de captura de imágenes actualmente disponibles pueden adquirir al menos 25 imágenes por segundo.¹⁰⁴

DISEÑOS DE MICROSCOPIA CONFOCAL IN VIVO

MICROSCOPIO CONFOCAL DE BARRIDO EN TÁNDEM (MCBT)

El MCBT contiene un disco de Nipkow giratorio que tiene 64.000 agujeros dispuestos en espiral de Arquímedes. Los agujeros son de 20-60 micras de diámetro, dependiendo del modelo de microscopio, y cada orificio tiene un orificio conjugado equivalente y diametralmente opuesto a él en el disco.

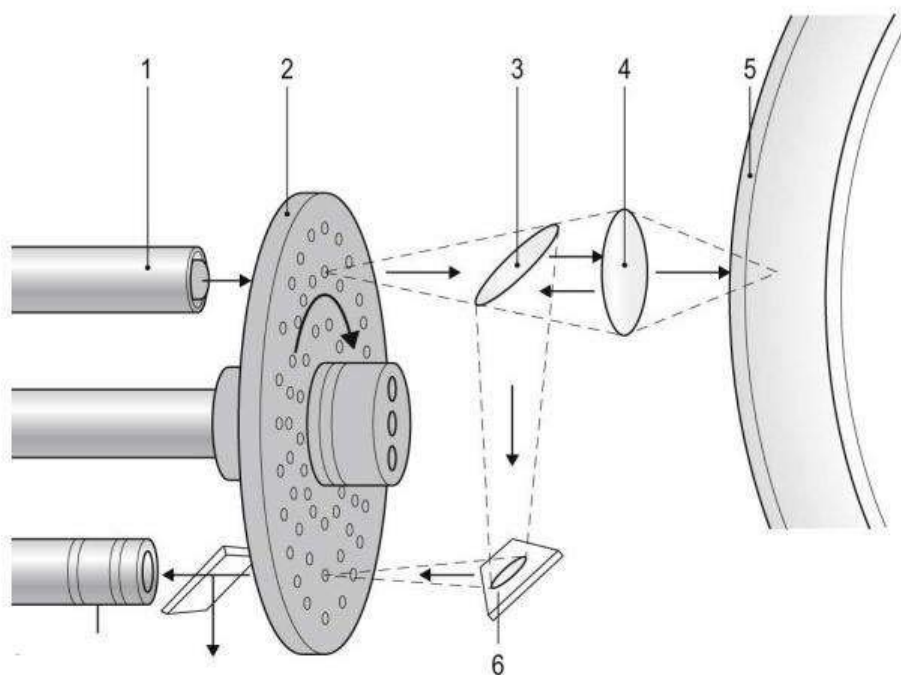


FIGURA 11. Esquema del microscopio confocal de barrido en tándem.

La luz procedente de una fuente de banda ancha (1) pasa a través de los agujeros en un lado de un disco de Nipkow (2) y un divisor de haz (3), y es enfocada por una lente objetivo (4) en la muestra (5). La señal reflejada o emitida es luego reflejada por el divisor de haz (3) y un espejo de superficie frontal (6) a los orificios conjugados en el lado opuesto del disco, que evitan que la luz desde el exterior del volumen óptico lleguen a una cámara o a un ocular

El disco gira a 900 revoluciones por minuto, la luz incidente pasa a través de aproximadamente 100 agujeros a la vez. La luz reflejada pasa a través de los agujeros conjugados en el lado diametralmente opuesto del disco. Esta rotación rápida del disco permite la exploración de la muestra completa. La relación de área del disco respecto a los agujeros determina la transmisión de la luz que oscila entre 0,5% a 1% (0,5% para agujeros de 20-micras).¹⁰³

Para compensar la pobre transmisión de luz que posee el MCBT, se necesita una fuente de luz muy brillante como pueden ser las lámparas de Mercurio y Xenón.

MICROSCOPIO CONFOCAL DE BARRIDO EN HENDIDURA (MCBH)

Al contrario que el MCBT, el MCBH utiliza dos rendijas conjugadas ópticamente para iluminar y detectar la luz reflejada. Una de las dos caras del microscopio explora mediante una rápida oscilación la imagen de una hendidura objetivo y escanea la luz reflejada desde el objeto. Este escaneado en rendija o hendidura tiene dos ventajas respecto al MCBT. En primer lugar el rendimiento de la luz es mayor. Esto significa que se puede usar una fuente de luz débil (una lámpara halógeno de 12-V) y por lo tanto tiene la ventaja de permitir hasta 30 min de examen continuo sin inducir una postimagen.¹⁰⁵ En segundo lugar, muchos puntos se analizan en paralelo y el tiempo de exploración es más corto. Sin embargo, el uso de una hendidura también significa que este microscopio sólo es verdaderamente confocal en el eje perpendicular a la altura de hendidura.¹⁰²

MICROSCOPIO CONFOCAL DE BARRIDO LÁSER (MCBL)

Otro diseño óptico de microscopía confocal in vivo es el microscopio confocal de barrido laser (MCBL), el HRT con el MCR. Se trata de un microscopio confocal in que utiliza como fuente un láser de diodo Helio Neón de una longitud de onda roja de 670-nm.

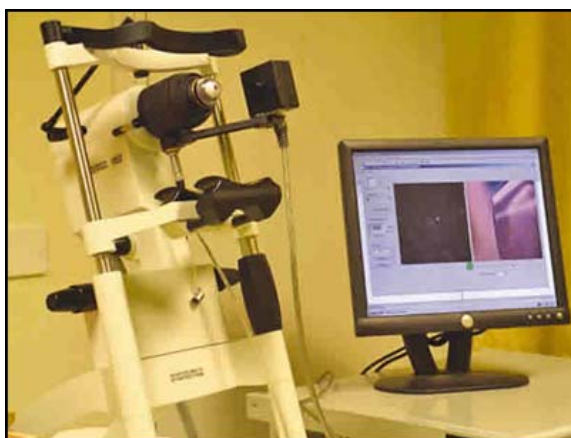


FIGURA 12. Imagen del microscopio confocal *Heidelberg retina Tomograph ii* junto con el módulo de córnea *Rostock* (MCR).

El láser usado es de clase 1 y por lo tanto, por definición, no supone ningún peligro para la integridad ocular. Sin embargo, para garantizar la seguridad del operador y de los sujetos, el fabricante impone un límite en el de exposición máxima para el paciente y el operador de 3.000 segundos (50 min) en un único examen.¹⁰⁵

El láser se escanea secuencialmente sobre cada punto del área examinada. Con el fin de escanear la imagen completa, el haz de láser debe desviarse en dos direcciones perpendiculares. Esto se logra mediante dos espejos de escaneado: un escáner resonante que va a escanear la zona horizontal para producir una línea de exploración o escaneado y un escáner galvanométrico que explora línea vertical para producir un análisis de campo. La luz reflejada se recoge mediante los dos espejos de exploración y se desvía a un detector que es un fotodiodo de avalancha (un detector puntual) para posteriormente digitalizarla y formar la imagen con estos datos.¹⁰⁶

Todos estos microscopios confocales poseen un sistema de enfoque automático o manual en el que el usuario puede elegir el espesor al que quiere tomar la muestra, haciendo desplazar la lente objetivo.^{102,103,106}

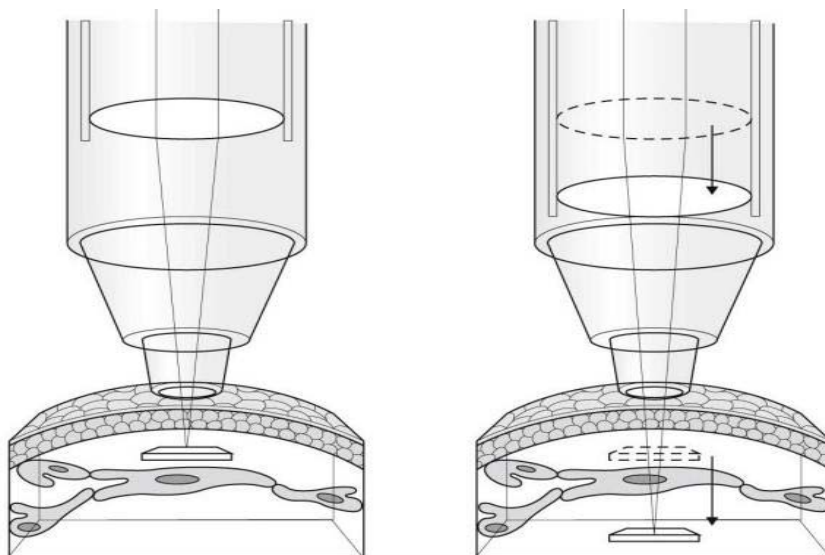


FIGURA 13. Esquema del enfoque del microscopio confocal sobre el tejido corneal.

1.5 OBSERVACIÓN DE LA CÓRNEA NORMAL CON MICROSCOPIA CONFOCAL

La córnea está compuesta por 5 capas: epitelio corneal, la capa de Bowman, el estroma, la membrana de Descemet y el endotelio. A excepción de la membrana de Descemet, todas las capas son visibles con microscopía confocal in vivo en una córnea normal. Debido a la magnificación y a la resolución que poseen los microscopios confocales disponibles actualmente, somos capaces de observar las células corneales y sus núcleos aunque no sus otros orgánulos.

OBSERVACIÓN DEL EPITELIO CORNEAL

Las células superficiales epiteliales miden 20-30 μm de longitud y 5 μm de ancho.¹⁰⁷ Estas células se observan como células poligonales de varios tamaños y reflectividad, con núcleos visibles y rodeados de una banda oscura.¹⁰⁸

Las células aladas son las que poseen menor reflectividad de todas las células de la córnea y muestran variaciones en su tamaño.¹⁰⁷ Se caracterizan por tener bordes y núcleos brillantes pero no poseen el anillo oscuro que rodea los núcleos observados en las células superficiales epiteliales.¹⁰⁷

Las células basales epiteliales tienen unas 10-15 μm de diámetro y forman un mosaico regular con cuerpos celulares oscuros y bordes brillantes.^{108,109}

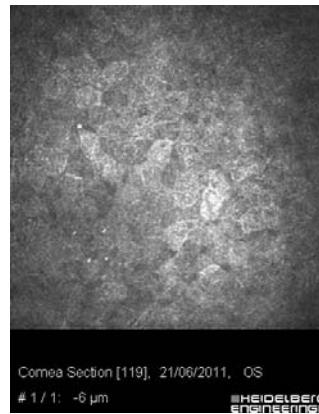


FIGURA 14. Observación de las células epiteliales superficiales y aladas con el microscopio confocal HRT II.

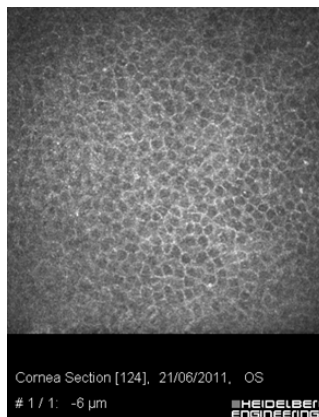


FIGURA 15. Observación de las células epiteliales basales de una córnea humana con el microscopio HRTII.

OBSERVACIÓN DE LOS NERVIOS SUB-BASALES

Los nervios corneales sub-basales mediante microscopía confocal in vivo, aparecen como líneas blancas bien definidas con una reflectividad homogénea. Se observan ramas dicotómicas (en forma de Y) y paquetes de conexiones delgadas en forma de H.¹¹⁰

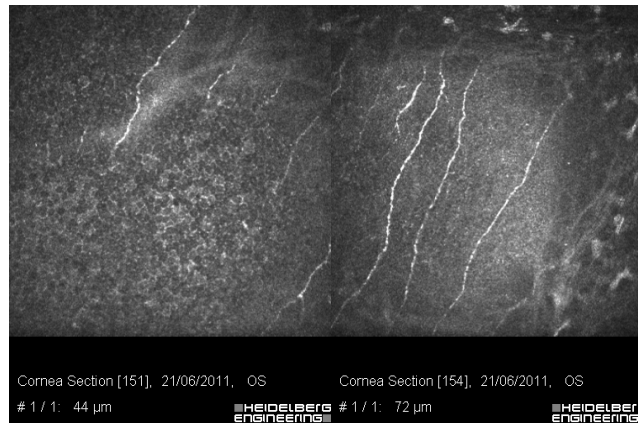


FIGURA 16. Observación de los nervios corneales sub-basales de una córnea humana observados con el microscopio confocal HRT II.

OBSERVACIÓN DE LA CAPA DE BOWMAN

La capa de Bowman en la córnea normal aparece como una capa homogénea y amorfa, y aunque se considera una capa acelular formada por haces de fibras de colágeno, mediante microscopía confocal se han observado células de Langerhans. Éstas pueden aparecer como partículas corpusculares de unas 15 µm de diámetro y se observan 3 morfologías distintas: cuerpos celulares individuales con procesos, células con apariencia dendrítica y células organizadas en una red mediante interdigitaciones dendríticas.¹¹¹

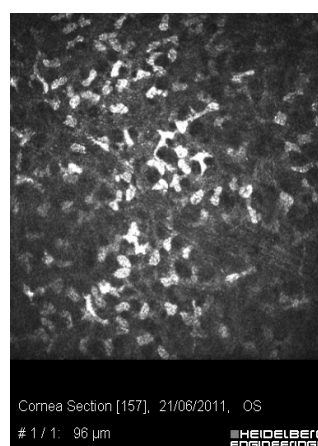


FIGURA 17. Observación de la capa de Bowman de una córnea humana con el microscopio confocal HRTII.

OBSERVACIÓN DEL ESTROMA CORNEAL

La microscopía confocal es capaz de mostrar las imágenes de los núcleos de los queratocitos. Aunque los cuerpos celulares, los procesos de los queratocitos y el colágeno estromal no son visibles con el MCBT y MCBH.¹⁰⁸ Los núcleos de los queratocitos aparecen bien definidos en el estroma anterior, con forma oval – redonda y con orientaciones distintas sobre un fondo oscuro. En el estroma medio, los queratocitos aparecen con una forma más regular y ovalada, y en el estroma posterior aparecen más alargados y con forma de eje.^{108,112}

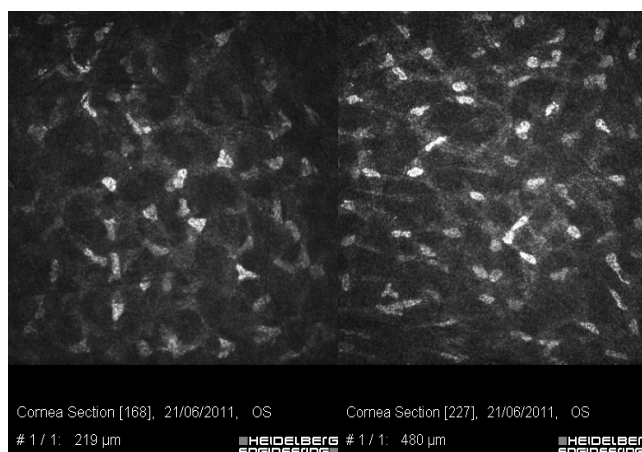


FIGURA 18. Observación del estroma corneal de una córnea humana con el microscopio confocal HRTII.

OBSERVACIÓN DE LA MEMBRANA DE DESCMET

La membrana de Descemet de la córnea normal no es visible en sujetos jóvenes y sin embargo con la edad se hace más visible. Mediante microscopía confocal, se observa una capa acelular entre el estroma posterior y el endotelio.¹¹²

OBSERVACIÓN DEL ENDOTELIO CORNEAL

Las células endoteliales aparecen en la microscopía confocal in vivo como una matriz regular de células hexagonales con cuerpos celulares brillantes y bordes

oscuros¹¹². Imre y colaboradores han demostrado una buena reproductibilidad de la imagen cuantitativa del endotelio corneal con la microscopía confocal in vivo entre distintos observadores, pudiéndose utilizar para cuantificar la densidad endotelial, al igual que se utiliza el microscopio especular.¹¹³

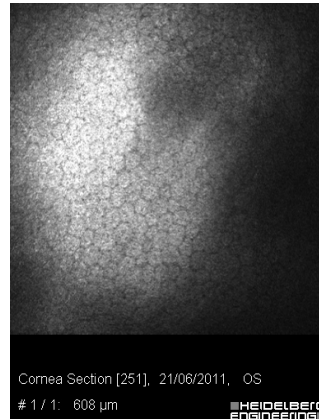


FIGURA 19. Observación del endotelio corneal de una córnea humana con el microscopio confocal HRTII.

1.6 APLICACIONES CLÍNICAS DEL MICROSCOPIO CONFOCAL

Aunque la microscopía confocal se ha utilizado ampliamente en investigación animal, su carácter no invasivo la hace ideal para su uso clínico en oftalmología.¹¹⁴ En los últimos años, la aplicación clínica de la microscopía confocal in vivo se ha expandido rápidamente y se está utilizando para monitorizar los cambios en la densidad de queratocitos durante el envejecimiento, en pacientes con queratocono, después de determinadas cirugías corneales, queratitis microbianas, distrofias y otras condiciones patológicas.^{115,116} Además, también se han estudiado los cambios temporales en la densidad y en la organización de los nervios subepiteliales en respuesta a una cirugía o a una determinada patología corneal¹¹⁷ y se ha cuantificado el efecto que producen las lentes de contacto en la morfología y el espesor del epitelio corneal.¹¹⁸⁻¹²¹

Debido a la capacidad única que posee el microscopio confocal para obtener imágenes de la córnea en cuatro dimensiones a nivel celular (x, y, z, t), es ideal para el seguimiento de lo que sucede en las células durante la curación de heridas epiteliales y estromales. Por ejemplo, la microscopía confocal permite medir la apertura de una herida, la profundidad de crecimiento epitelial y el grado de fibrosis corneal en heridas, así como observar la cicatrización que sucede después de la queratoplastia penetrante (PK).^{122,123}

El MCBT se ha utilizado para evaluar varios parámetros asociados con la cicatrización de heridas corneales tras PRK.¹²⁴ Se pueden evaluar los cambios en el espesor corneal, epitelial y estromal después de la cirugía refractiva. Además, la microscopía confocal se puede utilizar para evaluar el grado de haze o turbidez subepitelial inducida por los procedimientos de superficie. En general, la microscopía confocal in vivo representa una herramienta muy útil para la evaluación cuantitativa de la profundidad de fotoablación inicial, para evaluar los cambios temporales en el espesor del epitelio y estroma de la córnea y para observar la pérdida de células y / o repoblamiento después de cirugía refractiva, o para evaluar numerosos parámetros tras LASIK como grosor del flap, partículas en la interfase, etc...¹²⁵⁻¹³⁷

Podemos asegurar que el microscopio confocal es un arma valiosa para realizar un estudio sobre la respuesta de la córnea ante la cirugía refractiva corneal. Nos da la posibilidad de estudiar la respuesta corneal en el tiempo ante distintos traumas in vivo, cosa que no permite la microscopía convencional debido a que presenta estas dos limitaciones: no permite el estudio in vivo y no permite estudiar la misma córnea en distintos momentos. Debido a estas limitaciones el microscopio confocal se convierte en la única técnica que permite estudiar los cambios en la celularidad de la córnea y sus

implicaciones en la cicatrización tisular incluso varios años después de la cirugía refractiva.

1.7 RESPUESTA CORNEAL ANTE LA CIRUGÍA REFRACTIVA

La respuesta corneal ante cualquier procedimiento de cirugía refractiva, se puede dividir en dos aspectos: por un lado la respuesta biomecánica y, por otro lado, la respuesta de cicatrización tisular para reparar el daño quirúrgico.

RESPUESTA BIOMECÁNICA

Sabemos que la córnea no se comporta como un material inerte puramente elástico, sino que responde con un comportamiento viscoelástico determinado por la distribución e interrelación de las lamelas corneales.¹³⁸⁻¹⁴⁰ Las lamelas corneales se encuentran altamente interrelacionadas entre sí oblicuamente en las capas más anteriores de la córnea, donde muchas de ellas se insertan en la capa de Bowman y llevan un curso transversal hacia lamelas más profundas. El estroma posterior de la córnea muestra las lamelas ordenadas ortogonalmente, con un recorrido de limbo a limbo más paralelo entre sí.¹⁴¹ Debido a la distinta disposición de las lamelas entre el estroma anterior y posterior, se considera que el estroma anterior presenta más resistencia biomecánica que el posterior y por tanto es considerado el responsable del mantenimiento de la curvatura corneal normal, especialmente las 100-120 μm más anteriores.¹⁴²

Por otro lado, la viscoelasticidad corneal, se manifiesta en varias propiedades y se podría definir como la capacidad de la córnea para absorber parte de la energía que se le aplica. Por ejemplo, en el concepto de histéresis que consiste en que la relación fuerza-deformidad es distinta cuando el cuerpo es deformado que cuando recupera su forma original, se pone de manifiesto la viscoelasticidad de la córnea como la capacidad

de ésta de relajarse sin variar de longitud cuando se ve sometida durante un tiempo a la misma tensión. Otra característica biomecánica importante de las lamelas corneales es también su resistencia al deslizamiento de las capas subyacentes, gracias a las interrelaciones entre lamelas descritas previamente. Este comportamiento viscoelástico de la córnea puede jugar un papel importante en la aparición de complicaciones postquirúrgicas.^{141,142}

Debido a ésta disposición de las lamelas corneales, la respuesta de la córnea ante la ablación no sigue el modelo de un simple material puramente elástico, ya que en un material puramente elástico una lesión de las capas anteriores centrales resultaría en la herniación hacia delante de las capas subyacentes debido a la presión intraocular, lo cual provocaría un aumento en la curvatura de la córnea. Sin embargo, cuando se eliminan o se cortan las lamelas anteriores (por ejemplo al hacer una incisión circunferencial en toda la córnea periférica¹³⁹ o en una queratectomía fototerapéutica -PTK-), la disminución de la tensión en las lamelas superiores periféricas disminuye a su vez la resistencia de éstas frente al edema estromal provocado por la presión intraocular, de forma que la córnea periférica se engruesa. La expansión del estroma periférico tracciona de las lamelas centrales con las que aún se mantiene unido y produce un aplanamiento corneal central con el consiguiente cambio hipermetrópico. Si la ablación de la córnea central es excesivamente profunda, puede darse la situación en la que la tendencia elástica de las lamelas centrales a ceder ante la presión intraocular (incurvándose hacia delante) supere a la fuerza de tracción de la periferia que les hacía aplanarse y no aparezca un cambio hipermetrópico sino miópico, y una posible ectasia corneal.¹⁴¹

Teóricamente, el LASIK produce mayor riesgo de sobrepasar el límite del equilibrio viscoelástico de la córnea, ya que altera capas más profundas, donde la menor densidad

queratocitaria y la menor interrelación de las fibras de colágeno comparado con las capas anteriores de esta estructura podrían favorecer la incapacidad de las lamelas corneales para mantener su biomecánica estable y facilitar así la aparición de ectasia postquirúrgica.¹⁴¹

CICATRIZACIÓN TISULAR

La respuesta de cicatrización tisular la vamos a describir según la cirugía refractiva aplicada en la córnea, porque va a ser distinta si aplicamos en la córnea una ablación de superficie o mediante procedimientos en los que se crea un flap. Antes de revisar la respuesta a la cicatrización tisular debemos saber que la principal diferencia entre necrosis y apoptosis es que la necrosis es una disrupción explosiva de la célula en la cual los componentes intracelulares (las lisozimas, mitocondrias y otros orgánulos) son liberados dentro del tejido. La extravasación de estos componentes provoca un daño en el tejido circundante atrayendo a más células inflamatorias.^{167,168} Sin embargo, la apoptosis es una muerte celular más suave y organizada en la cual los componentes celulares y los orgánulos se mantienen dentro de la membrana celular y se denominan cuerpos apoptóticos. Durante la apoptosis no existe liberación hacia fuera de los contenidos intracelulares, por tanto, el daño en el tejido es menor y también es menor la infiltración por células inflamatorias.^{170,171}

RESPUESTA CORNEAL ANTE LA CIRUGÍA DE SUPERFICIE PRK Y LASEK

Tras PRK los mecanismos de cicatrización de la córnea dan lugar al desarrollo de una cicatriz fibrótica hipercelular localizada en el área ablacionada (estroma anterior), caracterizada por un aumento de la densidad queratocitaria, con aparición de miofibroblastos y con una matriz extracelular densa con abundante colágeno tipo III.¹⁴³ La ablación que sucede durante la PRK provoca inicialmente una apoptosis de queratocitos¹⁴¹ seguida de una migración y proliferación de los queratocitos

circundantes para repoblar la zona,¹⁴⁴ y una diferenciación de éstos hacia miofibroblastos.¹⁴¹ En el examen con microscopio confocal los queratocitos se pueden observar en esta fase más fácilmente que en estado quiescente, debido a que provocan una mayor dispersión de la luz por el aumento de reflectividad no sólo de su núcleo sino también de su cuerpo celular y sus prolongaciones.^{142,145,146} El tejido estromal dañado se elimina y se sustituye por colágeno y por matriz extracelular, dando lugar a un tejido más desorganizado y denso.¹⁴³ Al existir una desorganización en las fibras de colágeno, la transparencia corneal se ve afectada.^{143,145,146} El haze supone una pérdida de transparencia corneal que generalmente aparece en los primeros 3-6 meses tras la cirugía (haze precoz). Este haze suele disminuir progresivamente a partir del año tras la cirugía debido a la desaparición progresiva de los miofibroblastos, aunque también se han descrito casos de aparición de haze al año de LASEK sin complicaciones y usando mitomicina C (MMC) de forma profiláctica durante la cirugía, sugiriendo que la celularidad estromal no sufre significativamente el efecto de la MMC y los queratocitos mantienen su capacidad para activarse y proliferar en respuesta a un trauma corneal.¹⁴⁷⁻

153

En un intento por disminuir la incidencia de haze tras PRK, se desarrolló la técnica LASEK. El mantenimiento del epitelio desvitalizado por alcohol en la técnica LASEK iba dirigido a disminuir la interacción epitelio-estroma.^{154,155} El flap epitelial parece actuar como barrera para disminuir la llegada de las citoquinas al estroma a través de la lágrima, de forma que la interacción epitelio-estroma se ve disminuida, separando ligeramente los procesos de cicatrización del epitelio y del estroma, y de esta forma disminuyendo la remodelación estromal.¹⁵⁶

RESPUESTA CORNEAL AL LASIK

Tras la cirugía de LASIK la respuesta estromal es muy distinta a la que se observa tras una ablación de superficie, ya que la interacción epitelio-estroma se reduce al no haber daño al epitelio más que en las zonas límites del flap. Tras la técnica LASIK se ha observado una cicatriz no fibrótica e hipocelular caracterizada por una densidad de queratocitos disminuida y localizada en la interfase. Estudios histológicos han descrito estos queratocitos sin fenotipo de miofibroblastos, y con una matriz extracelular formada fundamentalmente por proteoglicanos, con escaso colágeno (y sin colágeno tipo III). Debido a que no hay conversión a miofibroblastos y a que hay menor formación de matriz extracelular tras LASIK que en las cirugías de superficie, la pérdida de transparencia corneal, el haze, es menor.¹⁴³

Varios estudios han mostrado como respuesta temprana a la cirugía LASIK con MK micropliegues en la capa de Bowman, partículas de dimensiones y reflectividad variables en la interfase y modificaciones morfológicas de los queratocitos. En general, tras LASIK con MK se ha observado una apoptosis inicial de los queratocitos localizada en el estroma anterior y una activación de los mismos localizada en el estroma posterior.^{127,159,171,172,173,174,175,176,177,179,180,181,182,183,184}

Estudios con más seguimiento de la cicatrización tisular ocurrida tras LASIK con MK han mostrado que esta apoptosis de queratocitos continúa y que la pérdida de queratocitos parece mayor en el estroma localizado inmediatamente antes y después de la zona ablacionada, entre los 6 meses y los 5 años tras la cirugía. Estudios histológicos muestran que el daño epitelial y estromal, es decir, la interacción epitelio-estroma que sucede tras la aplicación del MK es el causante de esta apoptosis de queratocitos localizada en la interfase, debido a que se han encontrado citoquinas que inducen la

apoptosis esparcidas en la interfase creada por el MK. También se han visto células epiteliales degenerándose en la interfase del LASIK años después de la cirugía, y estas células también pueden contribuir a la pérdida crónica de queratocitos ya que se van a encargar de liberar citoquinas apoptóticas difundidas en la interfase y dentro del estroma central.^{116,182-184}

RESPUESTA CORNEAL AL LÁSER FEMTOSEGUNDO

El láser femtosegundo se introdujo para evitar las complicaciones asociadas a los microqueratomos mecánicos. Pero a su vez genera una respuesta distinta en la cicatrización estromal que la descrita tras los microqueratomos mecánicos.

Los modelos iniciales de láseres femtosegundo estaban asociados con una gran respuesta inflamatoria y de hecho, la principal complicación detectada es la queratitis lamelar difusa (DLK). La DLK es una condición no infecciosa en la que aparece una infiltración celular en el borde del flap y en el lecho estromal tras la cirugía LASIK. Puede aparecer tras meses o incluso años después de la cirugía y al parecer, su prevalencia tras la aplicación del FS es ligeramente mayor que tras la aplicación del MK. También se han detectado diferencias significativas respecto a la muerte celular que tiene lugar durante la primera semana después de la creación del flap con el IntraLase de 15, 30, o 60 KHz respectivamente.^{172, 236}

RESPUESTA A LA CREACIÓN DEL FLAP

Los cortes realizados con el láser de 15 KHz y con niveles de energía altos (1,5-2,5 μ J) dan lugar a una mayor proliferación celular estromal y a más generación de miofibroblastos que aumentará en general la adhesión del borde del flap comparado con el MK. El daño epitelial que provocaba el láser de 15 KHz en los bordes del flap daba lugar a la liberación de citoquinas proinflamatorias como la interleuquina1 y el factor tumoral alpha que se va a unir a los queratocitos, dando como resultado un aumento de

la producción de quimioquinas por parte de los mismos y aumentando la infiltración por células inflamatorias.^{172,173}

El láser de 15 KHz generaba más necrosis celular en la córnea central y periférica las 24 horas posteriores a la creación del flap, cuando se compara la respuesta con los láseres de 30 KHz o 60 KHz y mucha más muerte celular que con un MK¹⁶⁷. La liberación de los contenidos intracelulares asociados con la necrosis celular, es un estímulo mucho mayor para las células inflamatorias infiltradas que los remanentes intracelulares de las células apoptóticas.^{170,172,185-189}

Debido a la respuesta inflamatoria y fibrótica y a la necesidad de reducir el tiempo de tratamiento que se observó con el láser de 15 KHz, se introdujeron los nuevos diseños ópticos de los láseres de FS de 30 KHz y 60 KHz.

Posterior a la creación del flap con los láseres de femtosegundo de 30 KHz o 60 KHz se observó que la necrosis es también la forma más habitual de muerte celular en el período postoperatorio temprano, pero con éstos niveles de energía, la necrosis se reduce tanto hasta el punto que la respuesta cicatricial e inflamatoria media no difiere de la encontrada tras la formación del flap con el MK.¹⁶⁷

Con el láser de femtosegundo de 60-kHz IntraLase y utilizando los niveles típicos de energía 0,8 a 1,2 mJ, durante la creación del flap, se producen niveles de inflamación similares a los que produce el microqueratomo 24 horas después de la cirugía.¹⁷¹

Netto y colaboradores y Medeiros y colaboradores en sus trabajos muestran que la respuesta inflamatoria es mínima cuando se usa el láser femtosegundo de 60-kHz para crear el flap, usando energías de 0.8 a 1.2 μ J.^{167,171,192}

Rocha y colaboradores refieren que en ocasiones se observa haze central en algunas córneas en las que se intenta crear un flap menor a 100 μm de grosor con el láser femtosegundo de 60-kHz.¹⁹³ Esto probablemente sea debido a que los flaps son tan finos que la respuesta corneal se puede asemejar a la observada con las cirugías de superficie (PRK y LASEK) descritas previamente. La mayor respuesta a la cicatrización se atribuye a que los leucocitos que invaden la córnea liberan los factores de crecimiento y las citoquinas que contribuyen al proceso de cicatrización estromal y esto implica una mayor generación de miofibroblastos en el borde del flap. Estos miofibroblastos tienen funciones contráctiles y producen colágeno y otros componentes de la matriz extracelular, en conjunto incrementando la adhesión del flap.¹⁵⁹ Esta mayor adhesión del flap puede ser una ventaja para los pacientes en cuanto a la prevención de los desplazamientos traumáticos del flap, pero al mismo tiempo supone una desventaja a la hora de realizar un retoque en el que sea necesario volver a levantar el flap. Se ha encontrado mayor dificultad para levantar el flap de nuevo en la cirugía LASIK en la que el flap se ha creado con un láser FS que aquella en la que se ha creado con un MK, sobre todo a partir de los 6 meses posteriores a la cirugía. Comparando esta adhesión entre distintos láseres de femtosegundo, el IntraLase de 60 KHz y 30 KHz, la adhesión es mayor con el IntraLase de 30 KHz haciendo necesario que el retoque de la cirugía realizada con este láser tuviese que ser con PRK o LASEK con MMC.¹⁵⁹

RESPUESTA EN LA INTERFASE

Sonigo y colaboradores evaluaron y compararon las modificaciones en la interfase tras la realización del flap con un MK y con un láser de femtosegundo y encontraron que la morfología de la interfase era muy similar cuando se usaba el mismo láser excimer para realizar la ablación en el estroma. Una observación interesante hecha por los autores fue la identificación de partículas reflectantes con el microscopio confocal in vivo en la

interfase de todos los ojos operados con LASIK, independientemente del método utilizado para la creación del flap, bien láser de FS o MK.¹⁸⁶ Se han postulado varias hipótesis respecto al origen de las partículas observadas con microscopía confocal en la interfase. Dawson y colaboradores¹⁹⁰ sugieren que las partículas transitorias que se observan en la interfase durante la etapa activa de cicatrización de la herida (definida como los primeros 6 meses después de la cirugía) pueden corresponderse a haces de fibras de queratocitos migrados, espacios extracelulares rellenos de material fibrilar, histiocitos que contienen vacuolas llenas de material fibrilar o vacuolas claras en queratocitos activados. Esta hipótesis la comparten los estudios de Sonigo y colaboradores¹⁸⁶ y Ramirez y colaboradores¹⁸⁷ debido a que encuentran partículas similares en córneas donde se ha usado tanto el láser de FS como el MK para crear el flap. Sin embargo otros autores sugieren que dichas partículas son de metal, plástico, lubricantes u otros materiales derivados de las cuchillas o de los engranajes de los MK.^{128,183,184}

En resumen, se ha observado mayor respuesta fibrótica en el margen del flap creado con el láser FS que en el margen del flap creado con el MK, especialmente cuando se usan los modelos de 15 kHz o 30 kHz de láser femtosegundo.^{184,185} Las diferencias entre femtosegundo y MK son mínimas pero aún apreciables cuando se usan los modelos de IntraLase de 60-kHz o 150-kHz para crear el flap.

RESPUESTA EN EL ESTROMA POSTERIOR

Respecto al daño que sufre el endotelio después de la creación del flap en la cirugía LASIK con un láser FS y bajo la observación de la microscopía de transmisión electrónica y estudio histológico, se ha visto que las fibras de colágeno del estroma posterior anteriores al endotelio, continúan bien organizadas y tienen poca o ninguna evidencia de daño,¹⁹¹ siempre que se mantenga un lecho residual de al menos 100 µm.

Normalmente los cirujanos tratan de mantener al menos 250 μm de lecho residual posterior por lo que de esta forma el riesgo de dañar el endotelio es mínimo cuando se usa el láser femtosegundo para crear el flap en la cirugía LASIK.^{186,187,189}

INFLUENCIA DEL TRATAMIENTO ESTEROIDEO POSTOPERATORIO

Debido a la mayor incidencia de inflamación observada tras la aplicación del láser FS el tratamiento esteroideo se modificó en relación al que se utiliza tras la aplicación del MK. Esta modificación en el tratamiento puede influir en la respuesta estromal a la cicatrización tisular que sucede tras la cirugía refractiva. Petroll y colaboradores estudiaron la respuesta celular estromal con el láser femtosegundo IntraLase 60-kHz y modificando el tratamiento esteroideo postquirúrgico (cada hora durante 1 día, 4 veces al día durante 7 días, en lugar de cada hora durante 1 día y 4 veces al día durante 4 semanas). Encontraron que la activación queratocitaria seguía presente donde el régimen esteroideo era menor, y no encontraron diferencias significativas entre grupos en la densidad de queratocitos utilizando el mismo láser con la misma energía.¹⁸⁸

La respuesta corneal ante la agresión quirúrgica va a depender de varios factores, como la lesión simultánea de epitelio y estroma (ablación de superficie) o fundamentalmente del estroma (LASIK), la utilización de fármacos que modulen la respuesta inflamatoria y cicatricial (corticoides, mitomicina-C) y los factores individuales que determinan las diferencias entre dos sujetos ante una misma agresión.^{159,169}

1.8 DENSIDAD DE QUERATOCITOS Y MANTENIMIENTO DEL ESTROMA

La apoptosis de los queratocitos es la primera respuesta estromal identificable después de que se produzca un daño en el epitelio por lo que la habilidad de medir su densidad puede ser muy valiosa para estudiar el papel que tienen estas células en la cicatrización que sucede en el estroma tras la cirugía refractiva. La pérdida postquirúrgica de los queratocitos puede influir en la respuesta de la cicatrización estromal. La densidad de queratocitos en córneas normales se ha estimado mediante histología indirectamente midiendo el contenido del ADN del estroma. Este método se ha usado para obtener la variación en la densidad de queratocitos en córneas normales, al ser un método invasivo es imposible su estudio in vivo.¹¹⁵ Para obtener la densidad de queratocitos in vivo, el único instrumento que nos lo permite es la microscopía confocal, ya que podemos cuantificar la población celular corneal y las posibles variaciones en la densidad celular. Hay varios estudios que han descrito una disminución en la densidad total de queratocitos en casos de queratocono usuarios de lentes de contacto y tras LASIK con MK con y sin complicaciones asociadas.²³³ Se han encontrado distribuciones no homogéneas de los queratocitos entre las capas estromales tras LASIK y tras ectasia post LASIK. Realmente, no se sabe cuál es el límite por debajo del cual un descenso del número de queratocitos supone realmente un riesgo para la estabilidad arquitectónica corneal pero al parecer una distribución homogénea de la densidad de queratocitos puede ser un factor preventivo de complicaciones tras la cirugía refractiva y frente a las patologías corneales.^{116, 222, 233}

Patel y colaboradores midieron la densidad queratocitaria estromal con el MCBT en córneas normales, no patológicas, obteniendo los valores reflejados en la **tabla 2**. Aunque como veremos posteriormente, es necesario medir la densidad control con el

microscopio confocal que se vaya a usar en cada caso, ya que la profundidad de foco es distinta entre aparatos y las densidades medidas entre los mismos no son comparables.¹¹⁵

Tabla 2. Densidad de queratocitos en córneas normales en distintas profundidades estromales.

Profundidad estromal (%)	Densidad de queratocitos
Estroma completo	20.522 \pm 2.981
Primera imagen contable	33.050 \pm 11.506
0-10% (anterior)	28.838 \pm 8.913
11-33%	20.916 \pm 4.032
34-66% (medio)	19.241 \pm 2.906
67-90%	19.081 \pm 2.703
91-100% (posterior)	19.947 \pm 3.254
Densidad expresada en células /mm ³ \pm DS	

1.9 ESTUDIOS CON MICROSCOPIA CONFOCAL DE LA DENSIDAD QUERATOCITARIA TRAS CIRUGÍA REFRACTIVA

El estudio histológico en córneas humanas es difícil. Rajan y colaboradores¹⁴⁴ han diseñado un modelo para mantener in vitro córneas humanas de banco de ojos en condiciones similares a las fisiológicas. Con este modelo, estudiaron el efecto en la población celular corneal de distintas profundidades de ablación con PRK, LASEK y LASIK.

ESTUDIOS CON MICROSCOPIA CONFOCAL PARA EVALUAR LA RESPUESTA ESTROMAL FRENTE A LA CIRUGÍA DE SUPERFICIE

Rajan y colaboradores describieron en córneas humanas mantenidas in vitro una depleción de queratocitos en las primeras semanas posteriores a la cirugía de superficie, tanto PRK como LASEK, pero con una repoblación queratocitaria progresiva, de forma

que a las 4 semanas de la cirugía se ha recuperado prácticamente el valor preoperatorio y, en algunos casos incluso lo superaba.¹⁴⁴

Los estudios con microscopía confocal en *córneas in vivo* referidos a cirugía de superficie muestran resultados contradictorios sobre todo en la densidad de queratocitos en el estroma anterior. Herrman y colaboradores²²¹ estudian 17 ojos tras LASEK. Describen una disminución en la densidad de queratocitos desde el primer mes postoperatorio, y una repoblación progresiva posterior en cada revisión hasta la del año, aunque al año la densidad de queratocitos estaba reducida si la comparamos con los valores preoperatorios. Erie y colaboradores encontraron una población queratocitaria disminuida con respecto a la preoperatoria a los 36 meses²²² y a los 5 años tras PRK.¹¹⁶ Sin embargo Frueh,²²³ describe un aumento de la densidad queratocitaria en el estroma anterior al mes y 4 meses de la cirugía, estudiando 18 ojos tras PRK. Moilanen y colaboradores tampoco encuentran un descenso en la población celular en 14 ojos 5 años tras PRK. La diferencia entre los estudios de Erie¹¹⁶ y Frueh²²³ probablemente se deba a la distinta profundidad en la que ambos realizan la medición: en la cicatriz hiperreflectante subepitelial en el caso de Erie, en la porción posterior de la cicatriz estromal en el caso de Frueh.

Otro estudio de Moller-Pedersen¹⁴⁵ describe en 17 ojos tras PRK un aumento en la densidad queratocitaria en el estroma anterior en las revisiones del mes y 6 meses tras la cirugía. En la revisión del año, la densidad en estroma anterior se había normalizado.

ESTUDIOS CON MICROSCOPIA CONFOCAL PARA EVALUAR LA RESPUESTA ESTROMAL FRENTE AL LASIK

La respuesta estromal frente al LASIK, por tanto, consiste en la formación de una cicatriz no fibrótica e hipocelular en la interfase, caracterizada por una densidad de

queratocitos disminuida. La ventaja de este tipo de cicatriz es que no produce pérdida de transparencia corneal.¹⁴³

Los estudios encontrados en los que se estudia la densidad queratocitaria con el microscopio confocal en córneas in vitro encontramos el estudio de Rajan en el que a las córneas son sometidas a LASIK creando el flap con un MK (Moria). Crea un flap de 160µm y aplica un tratamiento con láser excimer para -9D. Describen una disminución en la densidad de queratocitos en los 2 primeros días tras la ablación en la zona posterior del flap estromal (100-150 µm) y un descenso similar justo bajo la ablación (170 a 190 µm). Observaron un aumento en la densidad de los queratocitos 4 días y 6 días en la zona posterior del flap estromal y a los 10 días y 14 días en la zona justo bajo la ablación. A las 4 semanas la densidad de queratocitos había alcanzado el 96% de la densidad celular preoperatoria en la zona bajo la ablación comparado con el 78% que había alcanzado el flap estromal. Por tanto la densidad de queratocitos a las 4 semanas fue significativamente menor en el flap que en el lecho estromal, pero la repoblación celular fue siempre menor que la observada en el caso de PRK y LASEK previamente mencionados.¹⁴⁴

En animales y en el caso en el que el corte se realiza con un MK sin la posterior ablación con láser excimer, encontramos un estudio realizado por Twa en conejos en el que revisa que no hay cambios en la densidad queratocitaria 6 semanas después de la cirugía, aunque en este estudio mostraron que la población queratocitaria después del corte fue mayor que antes de las cirugías, especialmente en el flap estromal.²³²

En córneas humanas in vivo tras LASIK con MK Erie¹²⁵ y colaboradores observan en 17 ojos de 11 pacientes la densidad de queratocitos a los 3 años de la cirugía LASIK. Encuentra una depleción de la densidad de queratocitos localizada en la

zona adyacente a la ablación e indicando que la pérdida se mantiene a los 3 años de la cirugía. En un estudio posterior del mismo grupo y comparativo entre LASIK y PRK a largo plazo (5 años posteriores a las cirugías) encuentran de nuevo que la densidad de queratocitos está disminuida en el flap estromal en los siguientes porcentajes respecto a los valores preoperatorios: 22% a los 6 meses, 37 % a los 5 años. En el lecho estromal encuentran una disminución de un 18% al año y 42% a los 5 años. También observan que la densidad de queratocitos en el estroma posterior a los 5 años disminuye respecto a la previa en un 22%.¹¹⁶

ESTUDIOS CON MICROSCOPIA CONFOCAL PARA EVALUAR LA RESPUESTA ESTROMAL FRENTE AL LASIK-FS

Respecto al FS encontramos pocos estudios que hayan analizado la respuesta queratocitaria al FS in vivo en córneas humanas y ninguno con resultados a largo plazo. Petroll y colaboradores¹⁸⁸ estudian en 30 ojos de 30 pacientes la activación queratocitaria a los 3 meses de la cirugía y Ramirez¹⁸⁷ analiza las características de la interfase en un estudio comparativo con el flap obtenido con el MK. Pero ninguno de ellos revisa los posibles cambios en la densidad queratocitaria a largo plazo que pueden tener lugar tras el uso del FS para obtener el flap tras la cirugía LASIK.

Los estudios comparativos entre LASIK FS y LASIK con MK se han centrado en los aspectos ópticos de los flaps obtenidos.^{227,228} Sólo encontramos el estudio de Zhang y colaboradores²²⁹ en el que evalúan mediante microscopía confocal los cambios en el tejido corneal teniendo en cuenta la densidad de queratocitos obtenida en la interfase del flap, junto con la regeneración de las fibras nerviosas sub-basales tras LASIK con láser FS y con 2 tipos de MK combinada con la ablación con el láser excimer. Los hallazgos los recogen al mes a los 3 meses y a los 6 meses de las cirugías. En este estudio de casos Zhang divide a los pacientes en 3 grupos (FS LASIK de 11

casos con un flap de 110 μm , One Use Plus MK 16 casos con un flap de 110 μm y LASIK convencional con MK 16 casos y un flap en este caso de 140 μm). En este estudio miden la densidad de queratocitos obtenida en la interfase como marcador de inflamación. Concluyen que en los grupos en los que se ha realizado un flap de 110 μm bien sea con MK o FS parecen tener una mayor activación queratocitaria, ya que encuentran una mayor densidad de queratocitos en la interfase al mes y a los 3 meses. La reacción celular está relacionada con espesor del corte lamelar.²²⁹

En cuanto a los estudios en animales: Encontramos varios estudios en los que se revisa la respuesta del FS en la densidad celular estromal a corto plazo. Angunawela y colaboradores²³⁰ describen necrosis en las primeras horas después del corte con el FS en su estudio con 16 ratones, en este caso usando el láser FS VisuMax (Carl Zeiss Meditec AG, Jena, Germany). Kim y colaboradores¹⁷⁴ en su estudio realizado con 12 ojos de conejo encontraron más necrosis, una respuesta inflamatoria mayor y un aumento en la proliferación queratocitaria cuando se usaban altos niveles de energía en el láser femtosegundo IntraLase.¹⁴¹ Con niveles bajos de energía, como con el FS IntraLase de 60kHz, Netto¹⁶⁷ y de Medeiros¹⁷¹ en un estudio de 18 ojos de conejos no encuentran diferencias significativas cuando comparan la respuesta obtenida con el FS con la obtenida en el grupo de MK. Morishige¹⁸⁵ usó sólo el FS sin hacer corte para evitar el daño epitelial y sin realizar ablación con láser excimer en 15 ojos de conejos y no observó activación queratocitaria.

Sin embargo, en cuanto a las capas posteriores del estroma se ha encontrado un aumento en la densidad queratocitaria tras MK LASIK a los 3 meses de las cirugías. Esto puede ser consistente con la hipótesis de que después de un daño corneal, hay una depleción inicial de keratocitos alrededor del tejido dañado que dispara una respuesta de repoblación queratocitaria.^{126, 178}

Los estudios encontrados tienen en común que encuentran una depleción de queratocitos en la zona cercana a la ablación, pero no existe acuerdo ni estudios suficientes para conocer qué sucede en las capas más profundas del estroma y a largo plazo.²³³

CÁLCULO DE LA DENSIDAD DE QUERATOCITOS

La densidad de queratocitos en el estroma corneal se ha determinado mediante el conteo manual de núcleos de queratocitos observados en las imágenes proporcionadas por el microscopio confocal.¹¹⁵ Como hemos revisado, los núcleos de los queratocitos dispersan y reflejan una pequeña cantidad de luz que aunque se ha descrito que son visibles incluso con lámpara de hendidura,²¹⁹ son más prominentes con las imágenes del estroma que proporciona el microscopio confocal. La forma de obtener la densidad de queratocitos en los estudios encontrados ha sido obteniendo un conteo manual de los núcleos detectados como puntos brillantes en un área conocida, dividiéndolo por el volumen de la muestra y posteriormente multiplicado por la profundidad de campo efectiva. Esta profundidad de campo es necesario calcularla para cada microscopio, ya que dependiendo del microscopio confocal utilizado será distinta. Incluso se han encontrado diferencias entre confocales del mismo tipo, como el HRT II con el MCR. Zhivov y colaboradores⁹¹ calculan una profundidad de campo de 7,6 μ m con el MCR para el HRT II y sin embargo Twa y colaboradores²³² obtienen una profundidad de 7,8 μ m y 9,1 μ m, diferente a la proporcionada por el fabricante en ambos casos (4 μ m). Estas diferencias en cuanto al cálculo de la profundidad de campo nos sugiere que es necesario calcular esta profundidad con el microscopio confocal que se vaya a utilizar en cada trabajo.

MacLaren y colaboradores¹⁰⁰ sugieren en su estudio calcular la profundidad de foco del microscopio confocal mediante la distancia desde la aparición gradual de una célula a la desaparición gradual de esa célula, moviendo el escáner manualmente. El número de fotogramas en los que se ha visto la célula se multiplica por la distancia media entre imágenes. Otro método de cálculo que propone es medir la anchura total a la mitad de la intensidad máxima de un escaneado a través de una superficie brillante reflectante o de un punto luminoso. La medida la realizan con el CONFOSCAN 3 obteniendo imágenes a través de la superficie de un portaobjetos de vidrio de microscopio, sabiendo que la distancia entre fotogramas es $1,1\mu$. La profundidad de foco a media intensidad máxima se determinó a partir del aumento y disminución de la intensidad media en un área rectangular.¹⁰⁰

En los diferentes trabajos mencionados en esta introducción, el cálculo de la densidad de queratocitos se ha realizado de forma manual. Hay un estudio de McLaren²³⁴ en el que mide in vivo en 17 pacientes operados de LASIK 5 años tras la cirugía la densidad de queratocitos de forma manual y automatizada. En este estudio, McLaren y colaboradores presentan un algoritmo que identifica los objetos brillantes en las imágenes del estroma corneal obtenidas con el microscopio confocal para emular un observador humano y las comparan con la densidad calculada de forma manual. Las densidades entre ambos métodos fueron distintas pero las conclusiones respecto a los cambios en las densidades fueron las mismas. Las imágenes obtenidas con el HRT II y el MCR tienen un alto contraste comparadas con las de los otros microscopios confocales por lo que el conteo manual en el que se tienen que detectar los núcleos brillantes de los queratocitos se hace más fácil.²³⁵

2. JUSTIFICACIÓN

Como hemos podido comprobar a lo largo de esta introducción, la respuesta del estroma corneal ante las distintas cirugías refractivas es objeto de estudio, debido al efecto que el cambio en la densidad queratocitaria pudiera tener en casos especiales en la estabilidad corneal a largo plazo. La aparición de nuevos métodos para la obtención del flap, tales como el láser de FS, hace necesario el estudio de la respuesta cicatricial corneal que éste genera. El microscopio confocal es un instrumento muy útil para evaluar los posibles cambios a largo plazo que pueden surgir tras estas cirugías.

Como hemos podido revisar, ningún estudio analiza la respuesta celular estromal in vivo de la córnea humana tras en uso del láser FS a largo plazo y comparándolo con la actuación del MK.

A su vez, tampoco está clara cuál es la reacción de los queratocitos en las capas más profundas del estroma ante la realización de cirugía LASIK.

Por lo que se crea la necesidad de saber si el uso de un láser FS genera una respuesta celular diferente en el estroma con respecto al LASIK convencional realizado con MK y a su vez de valorar en ambos casos los cambios de los queratocitos en todas las capas de la córnea a largo plazo, incluidas las capas más profundas.

3. HIPOTESIS

Es posible medir mediante microscopia confocal la respuesta queratocitaria en todas las capas corneales ante la realización de cirugía refractiva tipo LASIK con MK y con láser de FS.

4. OBJETIVOS

- 1) Desarrollar un sistema de evaluación de la población queratocitaria en la población corneal con el microscopio confocal Heidelberg Retina Tomograph II (HRTII) usando el módulo de córnea Rostock (MCR).
- 2) Evaluar, con este método, la densidad queratocitaria en población joven candidata a cirugía refractiva corneal.
- 3) Evaluar los cambios a corto, medio y largo plazo de la densidad queratocitaria a distintas profundidades de la córnea, tras la cirugía LASIK usando un microqueratomo mecánico y compararlos con los cambios que suceden tras la cirugía LASIK usando un láser de femtosegundo.

5. MATERIAL Y MÉTODO

POBLACIÓN MUESTRAL

Los pacientes incluidos en los estudios que componen esta tesis doctoral son pacientes intervenidos en Vissum Madrid. El grupo control lo han formado pacientes jóvenes sanos, hombres y mujeres, no intervenidos de ninguna cirugía ocular, que acudieron a realizarse revisiones oftalmológicas a la clínica Vissum Madrid y no fueron diagnosticados de ninguna patología.

CRITERIOS DE EXCLUSIÓN GENERALES

En todos los estudios se excluyeron aquellos pacientes con refracción inestable, sospecha de queratocono, cirugía ocular previa (refractiva u otros procedimientos quirúrgicos), enfermedad ocular o enfermedades sistémicas que pudiesen alterar el proceso de cicatrización, tales como diabetes o trastornos del tejido conectivo. Todos los pacientes fueron informados mediante un consentimiento informado y participaron voluntariamente en los estudios.

Este estudio obtuvo la aprobación del comité ético y de investigación del Hospital Universitario La Princesa (Madrid, España) al cual pertenece la clínica Vissum.

CRITERIOS DE INCLUSIÓN

Para que los pacientes fueran incluidos en el estudio debían tener un error refractivo miópico simple y/o compuesto comprendido entre 0 y -8,50 D de esfera y entre 0 y -4,75 D de cilindro, y grosor corneal central mínimo de 500 μm . La decisión de realizar la cirugía LASIK con MK y con FS se basó en las preferencias del paciente tras haber sido informado de las ventajas e inconvenientes de ambos procedimientos.

EXAMEN PREOPERATORIO

Todos los pacientes fueron sometidos a un examen oftalmológico completo antes de la cirugía. La exploración incluía la toma de agudeza visual sin corrección (AVsc) y la agudeza visual con corrección (AVcc) (mediante los optotipos de Snellen, Nidek autochart projector CP 670, Nidek, Gamagori, Japón), tanto con la refracción manifiesta como con la ciclopléjica. Se realizó una exploración biomicroscópica con lámpara de hendidura, medida de la presión intraocular (CT-80, Topcon, Tokio, Japón), medición del grosor corneal central con paquimetría ultrasónica (DGH 5100 contact pachymeter, DGH Technology Inc, Exton, PA; OcuScan RXP, Alcon Laboratories, Inc. Fort Worth, TX), queratometría y topografía corneal (Dicon CT200, Vismed Inc., San Diego, Calif; CSO Costruzione Strumenti Oftalmici, Italia), medición del diámetro pupilar en condiciones mesópicas (pupilómetro Colvard, Oasis, Glendora, Calif) y exploración fundoscópica.

TÉCNICA QUIRÚRGICA

Las cirugías fueron realizadas por dos cirujanos (MAT Y LDB)

TÉCNICA LASIK CON MK

La cirugía se realiza con anestesia tópica (lidocaína 2%). Se desinfecta el ojo y la piel con povidona yodada y se colocan el paño quirúrgico estéril y un blefarostato rígido. Se realizan dos marcas asimétricas con *violeta de genciana* en la córnea. Se realiza el corte en la córnea para obtener un flap de bisagra superior con el microqueratomo M2 de Moria (Moria SA, Antony, Francia) Se levanta el flap con una espátula se seca el lecho estromal con una hemosteta y se centra el marcador del rastreo ocular en la pupila. La ablación se realiza con el láser excimer Esiris Schwind (Schwind Eye Tech Solutions, Kleinostheim, Germany). La zona óptica fue de 6 mm en todos los casos. Una vez

finalizada la ablación, el lecho estromal se lava con solución salina equilibrada y con la misma cánula de irrigación se recoloca el flap en su lugar, alineándolo con las marcas corneales realizadas al inicio de la cirugía. Se aplican gotas de antibiótico (ciprofloxacino 3mg/ml) y de antiinflamatorio no esteroideo (ketorolaco trometamol 5mg/ml) y se retiran el blefarostato y el paño quirúrgico.

TÉCNICA LASIK CON FS

La cirugía se realiza con anestesia tópica (lidocaína 2%). Se desinfecta el ojo y la piel con povidona yodada y se colocan el paño quirúrgico estéril y un blefarostato rígido.

Para crear el flap, se usa el láser femtosegundo IntraLase (Intralase Corp, Irvine, California, USA) de 60-kHz con los siguientes parámetros: patrón en rejilla, nivel de energía de 0.90 μ J, energía de corte de 0.90 μ J, una separación entre spot de 7 μ m, 70 grados de corte lateral, una bisagra de 50 grados de angulación, un flap esperado de 110 μ m y con un diámetro de 9mm. Se levanta el lentículo con una espátula, se seca el lecho estromal con una hemosteta y se centra el marcador del rastreo ocular en la pupila. La ablación se realiza con el láser excimer Esiris Schwind (Schwind Eye Tech Solutions, Kleinostheim, Germany). La zona óptica fue de 6 mm en todos los casos. Una vez finalizada la ablación, el lecho estromal se lava con solución salina equilibrada y con la misma cánula de irrigación se recoloca el flap en su lugar, alineándolo con las marcas corneales realizadas al inicio de la cirugía. Se aplican gotas de antibiótico (ciprofloxacino 3mg/ml) y de antiinflamatorio no esteroideo (ketorolaco trometamol 5mg/ml) y se retiran el blefarostato y el paño quirúrgico.

TRATAMIENTO POSTOPERATORIO

LASIK MK

Después de la operación el tratamiento consiste en lágrimas artificiales y antibiótico tópico (ofloxacin 3 mg/mL) aplicado 4 veces al día durante una semana, esteroides tópicos (dexametasona 1 mg/mL) aplicados 4 veces al día durante la primera semana. Posteriormente, se suspende el tratamiento manteniéndose el uso de lágrimas artificiales.

LASIK FS

Después de la operación el tratamiento consiste en lágrimas artificiales y antibiótico tópico (ofloxacin 3 mg/mL) aplicado 4 veces al día durante una semana, esteroides tópicos (dexametasona 1 mg/mL) aplicados 8 veces al día durante la primera semana. Posteriormente, se suspende el tratamiento manteniéndose el uso de lágrimas artificiales.

SEGUIMIENTO POSTOPERATORIO

Las revisiones postoperatorias en ambos grupos se realizan al día siguiente, al mes, a los 3 meses, a los 15 meses, y de los 3 a los 5 años después de ambas cirugías. En estas revisiones, se registran la AVsc en la revisión al mes de la cirugía. En la revisión de los tres meses, registran además la AVcc y la refracción manifiesta y ciclopléjica. Todos los pacientes son graduados en la misma habitación con la luz ajustada a condiciones mesópicas (considerando condiciones mesópicas entre 0.10 y 0,003 cd/m²)

La microscopía confocal in vivo se realizó en cada grupo de tratamiento (LASIK con MK y LASIK con FS) en las revisiones de los 3 meses, 15 meses y de los 3 a los 5 años posteriores a las cirugías.

MICROSCOPÍA CONFOCAL IN VIVO

Para realizar la microscopía confocal in vivo usamos el Heidelberg Retina Tomograph II (HRTII) con el módulo de córnea *Rostock* (MCR) con las siguientes características: un objetivo de inmersión de 60X con una apertura numérica de 0.9 (Olympus Tokio, Japan), una longitud de onda roja de 670-nm. Las dimensiones de las imágenes obtenidas con esta lente son de 400x400 μm . El fabricante indica que la resolución y el espesor de la sección óptica son de 1 μm y 4 μm respectivamente. Para obtener un escaneado de todo el espesor corneal, movemos de forma manual el enfoque del microscopio a través de todo el espesor corneal con el MCR, ya que si usamos el escaneado automático que posee el MCR sólo podremos observar 80 μm de la córnea a cualquier profundidad (el microscopio de esta forma captura 30 imágenes por segundo).

MONTAJE DEL MICROSCOPIO

En primer lugar debemos poner en el objetivo del láser la refracción en +12 dioptrías.



FIGURA 20. Imagen del microscopio confocal *Heidelberg retina Tomograph II* sin el módulo de córnea *Rostock*.

Después debemos acoplar el MCR en el objetivo del HRTII (Figura 21)



FIGURA 21. Imagen del microscopio confocal *Heidelberg retina Tomograph II* junto con el módulo de córnea *Rostock*

Una vez acoplado al HRT II el MCR, debemos aplicar una gota de gel Viscotears (Carbómero 980, 0.2%, Novartis, North Ryde, Australia) en la superficie de la lente del microscopio evitando las burbujas al colocar el capuchón de la lente (lens cap) (Figuras 22 y 23). Tenemos que tener en cuenta que uso de ultrasonidos y geles de viscosidad baja pueden dañar la lente del microscopio, por lo que es necesario usar este tipo de gel. Debemos ser muy cuidadosos debido al riesgo de infección de no tocar el frontal del capuchón mientras lo montamos, si lo hacemos debemos desecharlo y usar uno nuevo.



FIGURA 22. Gel “Viscotears” aplicado en la superficie de la lente del módulo de córnea *Rostock*.

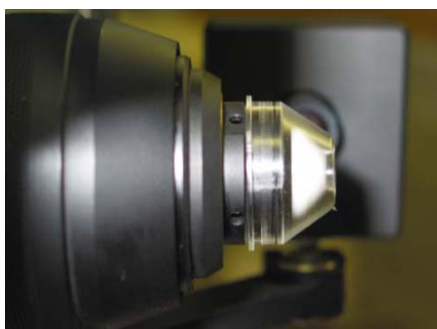


FIGURA 23. Lente del módulo de córnea *Rostock* con el gel aplicado y el capuchón.

Una vez esté el MCR acoplado procedemos a ajustar el enfoque para hacer coincidir el plano focal con la superficie externa del capuchón de la lente. Esto lo hacemos girando el objetivo del MCR hasta que un reflejo de láser brillante se vea en la ventana de la izquierda del programa (Figura 24). En este momento ponemos el enfoque a 0 (pulsando la tecla RESET de la pantalla).

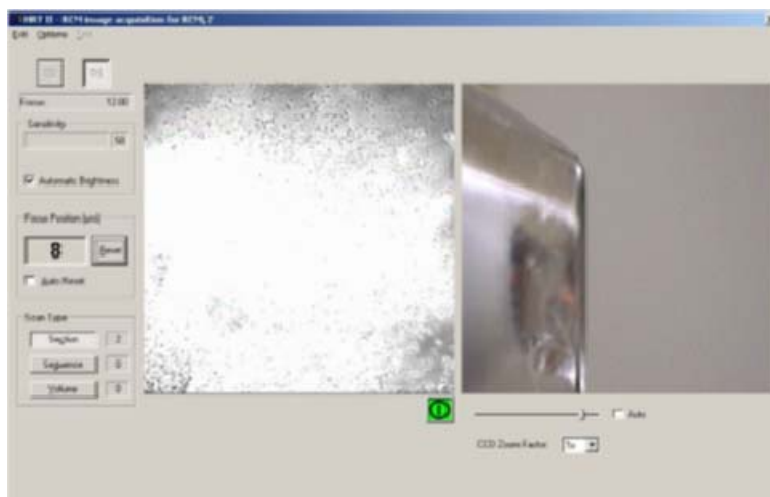


FIGURA 24. Modo de resetear el microscopio confocal *Heidelberg retina Tomograph II*: reflejo brillante en el programa de ordenador del microscopio confocal. En este momento ponemos el enfoque a 0 (pulsando la tecla reset de la pantalla).

PROCEDIMIENTO DE TOMA DE IMÁGENES EN LOS PACIENTES

Para realizar el examen con el microscopio confocal instilamos una gota de anestésico en cada ojo del paciente con clorhidrato de tetracaína al 1% (Alcon Cusí Lab., Spain). Como agente de acople entre el capuchón de la lente (lens cap) y la córnea, usamos Viscotears (Carbómero 980, 0.2%, Novartis, North Ryde, Australia) (Figura 25). El microscopio se va acercando al ojo del paciente mientras éste mira a un punto fijo, hasta que el capuchón de la lente entra en contacto con la córnea, siempre sin ejercer presión sobre ella. En el momento en el que aparezca la primera imagen del epitelio (células superficiales) al acercar el microscopio completo, ya sólo movemos el objetivo del MCR manualmente hasta obtener la imagen de toda la córnea.

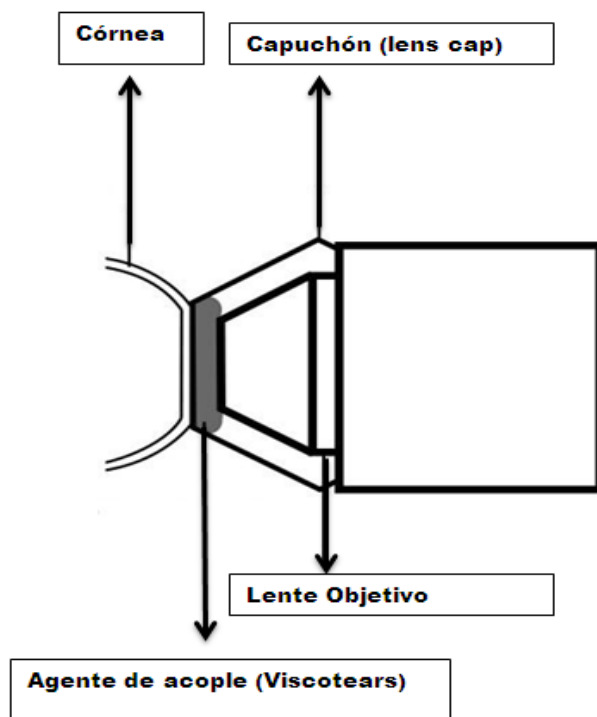


FIGURA 25. Esquema del contacto del microscopio confocal con la córnea del paciente.

Registramos 3 imágenes de la córnea completa de cada ojo. De estas 3 imágenes, se selecciona la imagen de la córnea completa que menos artefactos presente, debido al movimiento del paciente, para realizar el análisis de la densidad de queratocitos estromales.

Todas las imágenes fueron tomadas por la misma persona, quien desconocía el tipo de cirugía que había recibido el paciente. Cuando ambos ojos del mismo paciente cumplían los criterios de inclusión, sólo el ojo derecho se incluyó en el análisis.

MEDIDA DE LA DENSIDAD DE QUERATOCITOS

En cada imagen digital de 400 x 400 μm de la córnea, sólo un observador, siempre el mismo, seleccionó los núcleos celulares correspondientes a los núcleos de los queratocitos. Los núcleos que tocan el borde inferior de la imagen digital y el borde

izquierdo se cuentan, mientras que los núcleos que tocan el borde superior y el borde derecho, no se cuentan. El programa del microscopio confocal, expresa entonces la densidad de queratocitos en células por mm^2 (cels/ mm^2) (Figura 26). Para obtener la densidad de los queratocitos en volumen usamos la siguiente fórmula:

$$D = N / A\delta$$

Donde N es el número de células identificadas en el área A, y δ es el espesor de la sección óptica.

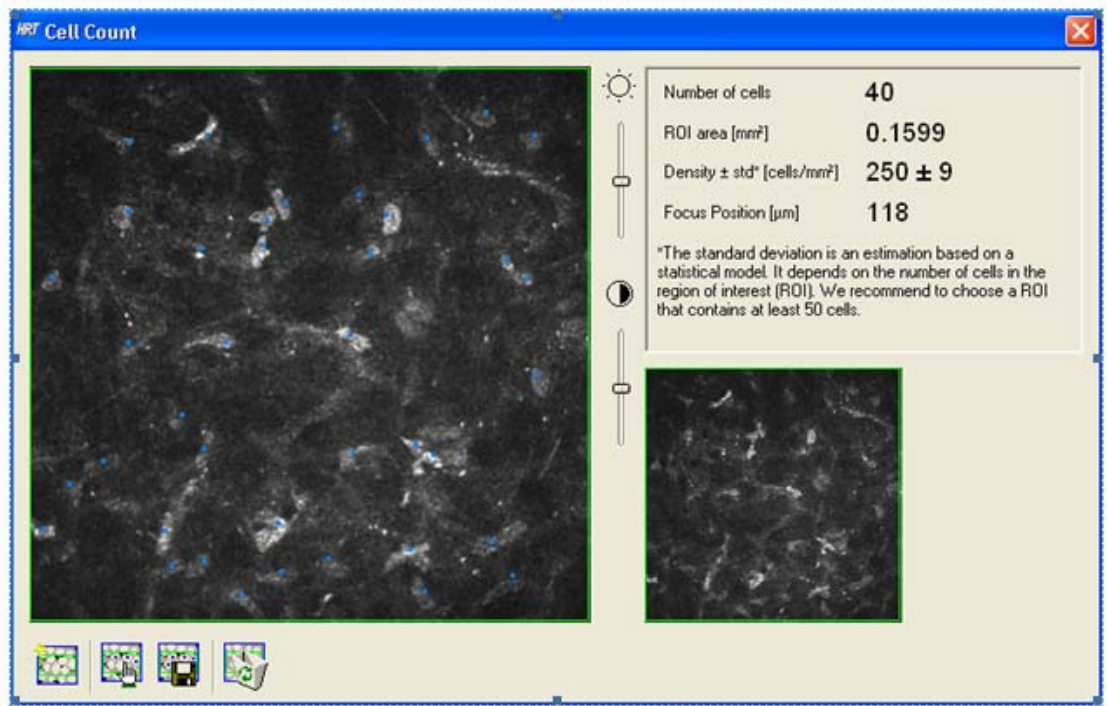


FIGURA 26. Método de selección manual de células para obtener la densidad de queratocitos a una profundidad determinada.

La sección óptica o profundidad de campo δ , la calculamos de la siguiente forma:

Como la distancia a la que se mueve el enfoque (escáner) desde la aparición gradual de una célula a la desaparición gradual de esa célula. El número de imágenes en las cuales una célula se cuenta se multiplica por la distancia media entre imágenes. Con este fin se usa el escaneado automático que posee el HRTII con el MCR y se obtienen 3 escaneados con un espesor de $77\mu\text{m}$, una media de captura de imágenes de 39 imágenes por escaneado y una distancia media entre imágenes de $1.93\ \mu\text{m}$. En cada uno de esos 3 escaneados automáticos se chequean 15 queratocitos (45 queratocitos en total). En nuestro microscopio confocal, con este método obtuvimos una profundidad de campo de **$15.63 \pm 1.82\ \mu\text{m}$** , que fue la utilizada para nuestros análisis.

PROFUNDIDADES A LAS QUE MEDIMOS LA DENSIDAD DE QUERATOCITOS

Las imágenes obtenidas con el microscopio confocal in vivo se analizan a las siguientes profundidades (Figura 27).

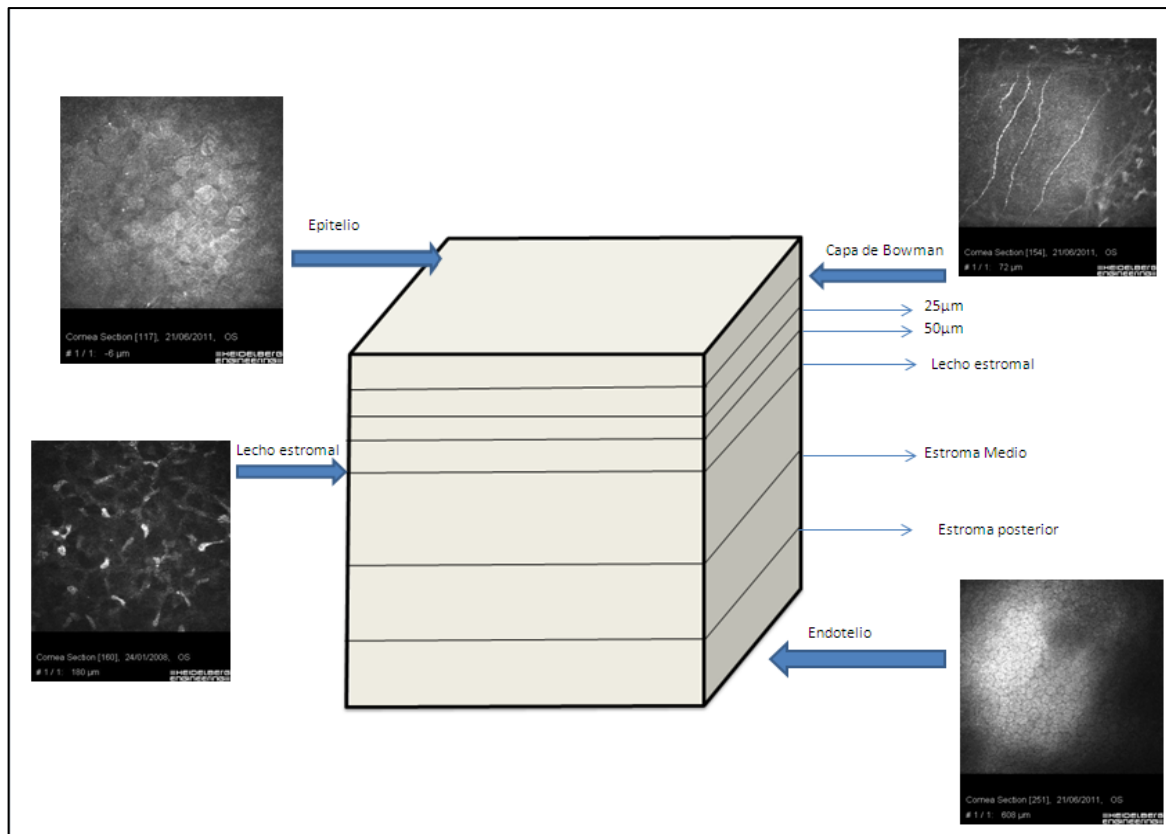


FIGURA 27. Esquema de las profundidades a las que se registran las medidas de la densidad de queratocitos en la córnea.

GRUPO LASIK MK

- 1) Sub-epitelio: Es la primera imagen de los queratocitos bajo epitelio.
- 2) 25 µm bajo la capa de Bowman
- 3) 50 µm bajo la capa de Bowman
- 4) Lecho estromal: justo bajo la interfase
- 5) Estroma medio. 200 µm sobre el endotelio
- 6) Estroma profundo. 50 µm sobre el endotelio

GRUPO LASIK FS

- 1) Sub-epitelio: Es la primera imagen de los queratocitos bajo epitelio.
- 2) 25 μm bajo la capa de Bowman.
- 3) 50 μm bajo la capa de Bowman.
- 4) Lecho estromal. Justo bajo la interfase.
- 5) Estroma medio. 200 μm sobre el endotelio.
- 6) Estroma profundo. 50 μm sobre el endotelio.

GRUPO CONTROL

- 1) Sub-epitelio: Es la primera imagen de los queratocitos bajo epitelio.
- 2) 25 μm bajo la capa de Bowman.
- 3) 50 μm bajo la capa de Bowman.
- 4) Lecho estromal. Calculamos la profundidad de ablación media realizada en cada uno de los grupos (-1.88 D de esfera, y -0.96 D de cilindro de media, por lo que calculando los parámetros de nuestro láser, la ablación estromal es de 40 μm) y le sumamos el grosor del flap estimado (110 μm). Por tanto los queratocitos se miden a 150 μm de profundidad en el grupo control y esta es la capa que se compara con el lecho estromal de los grupos de tratamiento con LASIK MK y LASIK FS.
- 5) Estroma medio. 200 μm sobre el endotelio.
- 6) Estroma profundo. 50 μm sobre el endotelio.

En todos los grupos, consideramos la densidad de queratocitos en el flap (media del flap) a la media obtenida entre la capa sub-epitelial, la capa 25 micras bajo Bowman y

la capa 50 μm bajo Bowman. Consideramos la media total de la densidad de queratocitos como la media entre estroma anterior (media entre el flap y el lecho estromal), estroma medio y estroma posterior.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La analítica descriptiva incluyó el cálculo de la media, desviación estándar y rango. Los parámetros cuantitativos se expresan por el valor de la media \pm la desviación estándar, seguido del rango entre paréntesis.

Para la comparación entre grupos se emplearon diferentes tests estadísticos: las comparaciones entre 3 grupos se han hecho con el ANOVA factorial aplicando la corrección de Bonferroni para comparaciones múltiples. Las comparaciones entre 2 grupos se han realizado con la t de Student considerando una diferencia estadísticamente significativa de $p < 0.05$.

El material y método específico de cada estudio realizado se describe a continuación:

FS LASIK VS CONTROLES

Realizamos un estudio prospectivo con observador enmascarado, de 30 pacientes consecutivos (59 ojos) que recibieron FS LASIK (31 ojos) y un grupo control de pacientes sanos no operados (28 ojos).

LASIK CON MK VS CONTROLES

Realizamos un estudio prospectivo con observador enmascarado, de 29 pacientes consecutivos (58 ojos) que recibieron LASIK con (30 ojos) y un grupo control de pacientes sanos no operados (28 ojos).

FS-LASIK VS MK-LASIK

Los grupos de estudio anteriores se compararon entonces entre sí.

6. RESULTADOS

En esta tesis doctoral hemos realizado un estudio prospectivo con observador enmascarado, en el que se han incluido 89 ojos consecutivos: 30 ojos en el grupo operado con LASIK con MK (MK-LASIK), 31 ojos en el grupo operado con LASIK con FS (FS-LASIK) y 28 ojos en el grupo control.

Los datos preoperatorios de los tres grupos se muestran en la **tabla 3**.

TABLA 3. Datos preoperatorios de los casos incluidos en la cirugía láser in situ keratomileusis con microqueratomo (MK-LASIK) y con láser femtosegundo (FS-LASIK) para crear el flap, comparado con un grupo control de córneas sanas no operadas.

	Control n= 28	FS-LASIK n= 31	MK-LASIK n=30	Valor P
Edad	27.46 ± 3.08 (22 a 34)	34.09 ± 7.68 (23 a 38)	35.70 ± 5.57 (26 a 37)	p= 0.0001
Esfera (D)	-2.96 ± 2.14 (0 a -8.50)	-1.65 ± 1.90 (0 a -4.50)	-2.11 ± 2.67 (0 a -4.50)	p= 0.007
Cilindro(D)	-0.31 ± 0.52 (0 a -2.00)	-0.89 ± 1.00 (0 a -4.75)	-1.03 ± 0.72 (0 a -3.00)	p= 0.004

Los datos se muestran como: media ± desviación estándar (rango).

Las comparaciones entre los datos preoperatorios fueron estadísticamente significativas entre los grupos FS y control y entre MK y control. Sin embargo entre los grupos FS y MK no existían diferencias significativas.

FS-LASIK VS CONTROLES

Los resultados de la comparación entre el grupo control y el grupo LASIK con FS se muestran en la **tabla 4**. Hemos encontrado que la densidad de queratocitos a través del flap estromal y en el lecho estromal decrece a los 15 meses de la cirugía comparada con la obtenida a los 3 meses de la cirugía y comparada con el grupo

control. Parece que después de este período, la densidad de los queratocitos se mantiene estable porque no hay diferencias significativas entre las densidades medidas a los 15 meses y a los 3-5 años, después de la cirugía.

En el estroma medio y posterior, la celularidad aumenta a los 3 meses de la cirugía al compararlo con el grupo control y disminuye después hasta niveles normales en las siguientes visitas. Este aumento en las capas más profundas hace que la media total de la densidad de queratocitos en toda la córnea sea significativamente mayor que en los controles a los 3 meses posteriores a la cirugía de LASIK con FS, pero en las siguientes visitas no existen diferencias significativas, a pesar de que detectamos que en el flap la densidad de queratocitos es menor en esas visitas.

TABLA 4. Comparación de la densidad de queratocitos en córneas sanas no operadas (grupo control) y en casos después de laser in situ keratomileusis con un láser femtosegundo (FS-LASIK) a los 3 meses, 15 meses y 3 a 5 años después de la cirugía. Media del flap: media entre subepitelio, 25 µm bajo Bowman y 50 µm bajo Bowman. Estroma medio: 200 µm sobre endotelio. Estroma posterior: 50 µm sobre endotelio. Media total: media entre el estroma anterior (media del flap +lecho estromal), estroma medio y estroma posterior.

	Controles n= 28	3 meses post-op n= 31	15 meses post-op n= 31	3 -5 años post-op n= 31	Valor de P	Comparaciones estadísticamente significativas
Sub-epitelio	29660.71 ± 5904.80 (20333.33 a 42666.66)	23898.92 ± 8136.59 (14666.66 a 42666.66)	18369.40 ± 5084.90 (10066.66 a 29200)	17680.90 ± 4236.61 (9200 a 26266.66)	p= 0.0001	Controles vs 3m/15m/3-5 ^a
25 µm bajo Bowman	21668.19 ± 3037.24 (14333.33 a 17500)	24916.12 ± 8447.90 (11000 a 40000)	18140.00 ± 5908.14 (10866.66 a 31866.66)	16956.58 ± 4475.73 (9666.66 a 25133.33)	p= 0.0001	Controles vs 3m/15m/3-5a 3m vs 15m/3-5 ^a
50 µm bajo Bowman	19671.42 ± 2548.61 (14600 a 25200)	24356.98 ± 5620.48 (12000 a 37066.66)	15062.22 ± 3785.55 (7533 a 21400)	16296.77 ± 4443.65 (9666.66 a 25600)	p= 0.0001	Controles vs 3m/15m/3-5a 3m vs 15m/3-5 ^a
Media del Flap	23666.77 ± 2621.42 (18666.66 a 28222.22)	24390.68 ± 5877.38 (14444.44 a 37088.88)	17190.15 ± 4452.34 (10488.85 a 27488.88)	16978.22 ± 2835.89 (10688 a 22614.66)	p= 0.0001	Controles vs 15m/3-5 ^a 3m vs 15m/3-5 ^a
Lecho estromal	19528.57 ± 2275.72 (14666.66 a 22866.66)	20974.88 ± 4842.61 (11400 a 27933.33)	17292.42 ± 3505.48 (11110.66 a 27000)	16040.90 ± 3596.67 (9110.66 a 22266.66)	p= 0.0001	Controles vs 15m/3-5 ^a 3m vs 15m/3-5 ^a
Estroma medio	18505.95 ± 1996.06 (14880 a 21533)	25883.14 ± 8142.06 (14933.33 a 40733.33)	19535.75 ± 3227.62 (14200 a 26466.66)	19560.88 ± 2502.39 (14000 a 24200)	p= 0.0001	3m vs controles/15m/3-5 ^a
Estroma posterior	18439.00 ± 2139.68 (13666. a 22800)	25529.37 ± 9360.38 (13933.33 a 47000)	21053.02 ± 3451.85 (13466.66 a 28733.33)	18862.96 ± 3094.51 (13400 a 24000)	p= 0.0001	3m vs controles/15m/3-5 ^a
Media total	19513.90 ± 1733.83 (15662.96 a 22366.66)	24698.43 ± 6566.85 (14122.22 a 36729.63)	19276.81 ± 2722.02 (13741.81 a 25962.96)	18311.13 ± 2158.70 (14969.11 a 23159.11)	p= 0.0001	3m vs controles/15m/3-5

Los datos se muestran como: media ± desviación estándar (rango) y están expresados como cel/mm³.

MK-LASIK VS CONTROLES

Los cambios en la densidad de queratocitos después de MK-LASIK se muestran en la **tabla 5**. La densidad celular corneal tras LASIK con MK cambia con el tiempo demostrando un patrón similar al descrito tras la cirugía LASIK con FS, con la excepción de que la densidad celular en el lecho estromal a los 3 meses de la cirugía LASIK con MK aumenta significativamente comparado con el grupo control, este hecho no se ha detectado tras la cirugía LASIK con FS. La densidad de queratocitos a través del flap estromal y en el lecho estromal decrece a los 15 meses de la cirugía comparada con 3 meses después de la cirugía y comparada con el grupo control. A los 3 meses se observa un aumento de la densidad celular en el lecho estromal pero a partir de los 15 meses se mantiene estable ya que no hay diferencias significativas entre las densidades medidas a los 15 meses y a los 3-5 años, después de la cirugía LASIK con MK. En el estroma medio y posterior, la celularidad aumenta a los 3 meses de la cirugía al compararlo con el grupo control y disminuye después hasta niveles normales en las siguientes visitas. Este aumento en las capas más profundas hace que la media total de la densidad de queratocitos en toda la córnea sea significativamente mayor que en los controles a los 3 meses posteriores a la cirugía de LASIK con MK, pero en las siguientes visitas no existen diferencias significativas, a pesar de que, al igual que ocurría con el grupo LASIK con FS, detectamos que en el flap la densidad de queratocitos es menor en esas visitas.

TABLA 5. Comparación de la densidad de queratocitos en córneas normales no operadas (grupo control) y los casos después de laser in situ keratomileusis con un microqueratomo mecánico (MK-LASIK) 3 meses, 15 meses y a los 3 a 5 años después de las cirugías. Media del flap: media entre subepitelio, 25 µm bajo Bowman y 50 µm bajo Bowman. Estroma medio: 200 µm sobre endotelio. Estroma posterior: 50 µm sobre endotelio. Media total: media entre el estroma anterior (media del flap +lecho estromal), estroma medio y estroma posterior.

	Controles n= 28	3 meses postop n= 30	15 meses postop n= 30	3-5 años postop n= 30	Valor P	Comparaciones estadísticamente significativas
Sub-epitelio	29660.71 ± 5904.80 (20333.33 a 42666.66)	23995.55 ± 8707.43 (12200 a 37266.66)	16220.14 ± 5989.14 (12266.66 a 41333.33)	18578.44 ± 4329.90 (12400 a 27422)	p= 0.0001	Controles vs 3m/15m/3-5a 3m vs 15m/3-5 ^a
25 µm bajo Bowman	21668.19 ± 3037.24 (14333.33 a 27600)	24155.55 ± 8200.95 (12260 a 37666.66)	18230.00 ± 6334.14 (10666.66 a 31333.33)	19353.33 ± 4532.55 (10933.33 a 26400)	p= 0.0001	3m vs controles/15m/3-5 ^a
50 µm bajo Bowman	19671.42 ± 2548.61 (14600 a 25200)	23970.11 ± 7305.37 (13466.66 a 43666.66)	17203.09 ± 5397.01 (10533.33 a 30533.33)	18442.22 ± 4411.46 (12266.33 a 26866.66)	p= 0.0001	3m vs controles/15m/3-5 ^a
Media del Flap	23666.77 ± 2621.42 (18666.66 a 28222.22)	24040.74 ± 6772.03 (13622.22 a 39200)	19018.41 ± 5312.51 (12888 a 32577.77)	18791.33 ± 3597.93 (12407.33 a 16266.66)	p= 0.0001	Controles vs 15m/3-5 ^a 3m vs 15m/3-5 ^a
Lecho estromal	19528.57 ± 2275.72 (14666.66 a 22866.66)	24868.88 ± 8304.16 (13133 a 42866.66)	18456.16 ± 3857.06 (12333.33 a 24533.33)	16665.13 ± 3897.19 (12266.60 a 30066.66)	p= 0.0001	3m vs controles/15m/3-5 ^a
Estroma medio	18505.95 ± 1996.06 (14880 a 21533)	28917.77 ± 10271.52 (13600 a 49400)	20945.54 ± 2939.03 (17200 a 30000)	19016.97 ± 2245.63 (14333.33 a 24066.66)	p= 0.0001	3m vs controles/15m/3-5 ^a
Estroma posterior	18439.00 ± 2139.68 (13666 a 22800)	29484.44 ± 9788.27 (16400 a 47600)	18858.52 ± 4733.50 (14000 a 31266.66)	19406.62 ± 2800.45 (12407.33 a 16266.66)	p= 0.0001	3m vs controles/15m/3-5 ^a
Media total	19513.90 ± 1733.83 (15662.96 a 22366.66)	27619.01 ± 8679.22 (15700.00 a 42211.11)	19513.78 ± 3197.56 (16259.25 a 28803.70)	18717.27 ± 2020.92 (16440.74 a 24866.66)	p= 0.0001	3m vs controles/15m/3-5 ^a

Los datos se muestran como: media ± desviación estándar (rango) y están expresados como cel/mm³

FS-LASIK VS MK-LASIK

3 MESES DESPUÉS DE LAS CIRUGÍAS

Las comparaciones entre densidades obtenidas en ambas técnicas a los 3 meses se muestran en la **tabla 6**.

TABLA 6. Comparación de la densidad de queratocitos después de laser in situ keratomileusis con microqueratomo mecánico (MK-LASIK) y láser femtosegundo (FS-LASIK) 3 meses después de las cirugías. Los datos se muestran como: media \pm desviación estándar (rango) y están expresados como cel/mm³.

	3 meses post FS-LASIK n= 31	3 meses post MK-LASIK n= 30	Valor P
Estroma anterior	23898.92 \pm 8136.59 (14666.66 a 42666.66)	23995.55 \pm 8707.43 (12200 a 37266.66)	0.9
25 μm bajo Bowman	24916.12 \pm 8447.90 (11000 a 40000)	24155.55 \pm 8200.95 (12260 a 37666.66)	0.7
50 μm bajo Bowman	24356.98 \pm 5620.48 (12000 a 37066.66)	23970.11 \pm 7305.37 (13466.66 a 43666.66)	0.8
Media del flap	24390.68 \pm 5877.38 (14444.44 a 37088.88)	24040.74 \pm 6772.03 (13622.22 a 39200)	0.8
Lecho estromal	20974.88 \pm 4842.61 (11400 a 27933.33)	24868.88 \pm 8304.16 (13133 a 42866.66)	0.02
Estroma medio	25883.14 \pm 8142.06 (14933.33 a 40733.33)	28917.77 \pm 10271.52 (13600 a 49400)	0.2
Estroma posterior	25529.37 \pm 9360.38 (13933.33 a 47000)	29484.44 \pm 9788.27 (16400 a 47600)	0.1
Media total	24698.43 \pm 6566.85 (14122.22 a 36729.63)	27619.01 \pm 8679.52 (15700.00 a 42211.11)	0.1

Los datos se muestran como: media \pm desviación estándar (rango) y están expresados como cel/mm³

Estos datos están representados gráficamente en la figura 28. En general se observa una mayor densidad de queratocitos tras la cirugía LASIK con MK. La única diferencia que alcanzó la significación estadística fue la medida de la densidad de queratocitos en el lecho estromal a los 3 meses de la cirugía, siendo mayor la densidad tras LASIK con MK.

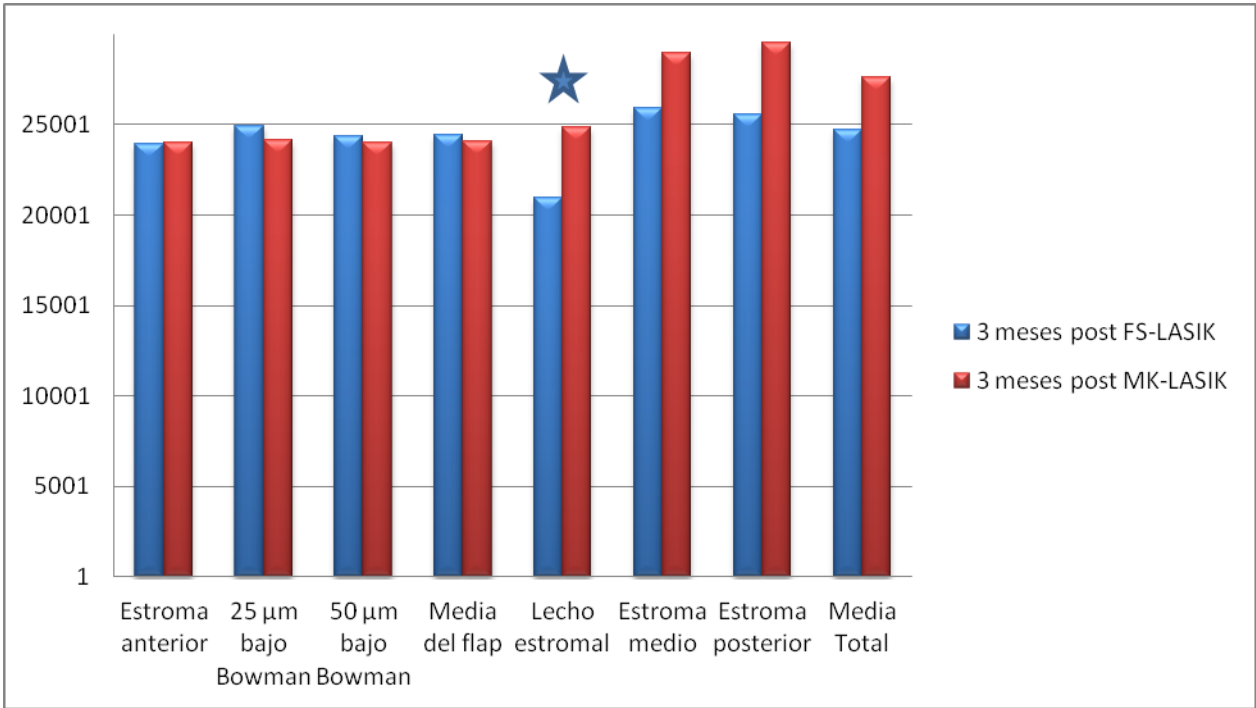


FIGURA 28. Representación de la densidad de queratocitos a los 3 meses. Comparación FS-LASIK y MK-LASIK. Diferencia estadísticamente significativa ★

15 MESES TRAS LAS CIRUGÍAS.

Los resultados de las densidades obtenidas en cada grupo a los 15 meses los hemos agrupado en la **tabla 7** y están representadas gráficamente en la figura 29. No existen diferencias significativas en la media total de la densidad celular entre ambos grupos.

TABLA 7. Comparación de la densidad de queratocitos después de laser in situ keratomileusis con microqueratomo mecánico (MK-LASIK) y láser femtosegundo (FS-LASIK) 15 meses después de las cirugías. Los datos se muestran como: media \pm desviación estándar (rango) y están expresados como

15 meses post FS-LASIK	15 meses post MK-LASIK	Valor <i>P</i>
n= 31	n= 30	

cel/mm³.

Estroma Anterior	18369.40 ± 5084.90 (10066.66 a 29200)	16220.14 ± 5989.14 (12266.66 a 41333.33)	0.02
25 μm bajo Bowman	18140.00 ± 5908.14 (10866.66 a 31866.66)	18230.00 ± 6334.14 (10666.66 a 31333.33)	0.9
50 μm bajo Bowman	15062.22 ± 3785.55 (7533.00 a 21400)	17203.09 ± 5397.01 (10533.33 a 30533.33)	0.08
Media del flap	17190.15 ± 4452.34 (10488.85 a 27488.88)	19018.41 ± 5312.51 (12888 a 32577.77)	0.1
Lecho estromal	17292.42 ± 3505.48 (11110.66 a 27000)	18456.16 ± 3857.06 (12333.33 a 24533.33)	0.2
Estroma medio	19535.75 ± 3227.62 (14200 a 26466.66)	20945.54 ± 2939.03 (17200 a 30000)	0.08
Estroma Posterior	21053.02 ± 3451.85 (13466.66 a 28733.33)	18858.52 ± 4733.50 (14000 a 31266.66)	0.04
Media total	19276.81 ± 2722.02 (13741.81 a 25962.96)	19513.78 ± 3197.56 (16259.25 a 28803.70)	0.7

Los datos se muestran como: media ± desviación estándar (rango) y están expresados como cel/mm³

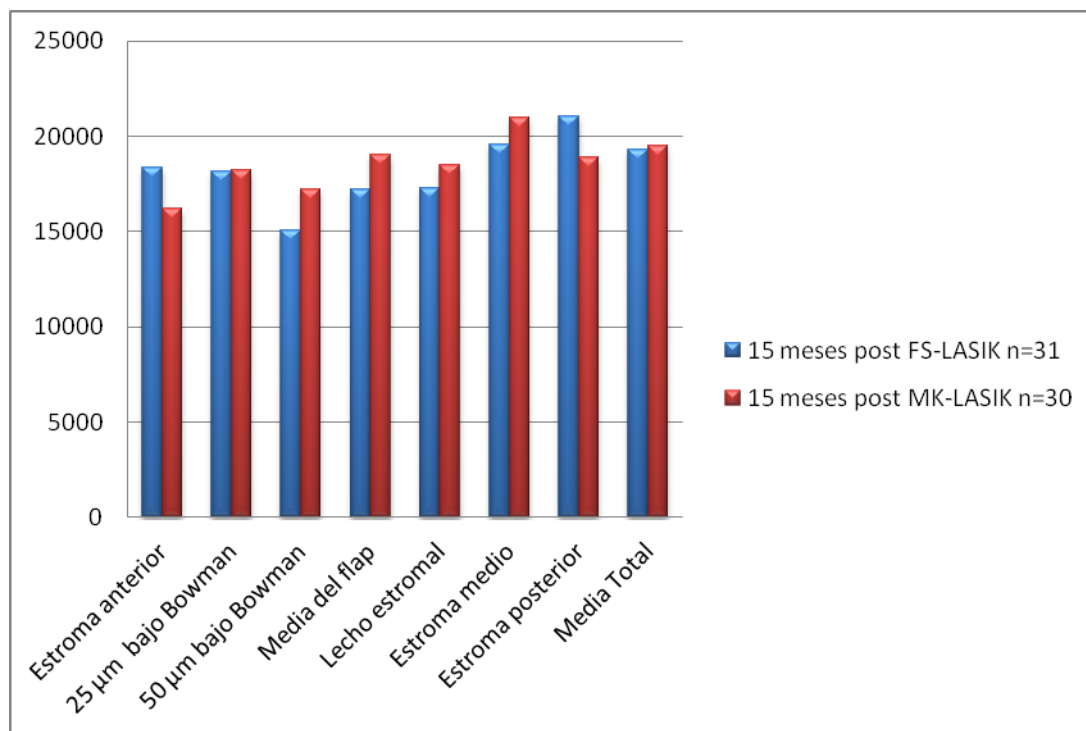


FIGURA 29. Representación de la densidad de queratocitos a los 15 meses. Comparación FS-LASIK y MK-LASIK.

3 A 5 AÑOS TRAS LAS CIRUGÍAS

Los resultados de las densidades obtenidas en cada grupo a los 3 y 5 años posteriores a la cirugía LASIK con FS y a la cirugía LASIK con MK están representados en la **tabla 8**

TABLA 8. Comparación de la densidad de queratocitos después de laser in situ keratomileusis con microqueratomo mecánico (MK-LASIK) y láser femtosegundo (FS-LASIK) 3-5 años después de las cirugías.

	3 -5 años post FS-LASIK n= 31	3 -5 años post MK-LASIK n= 30	Valor <i>P</i>
Estroma Anterior	17680.90 ± 4236.61 (9200 a 26266.66)	18578.44 ± 4329.90 (12400 a 27422)	0.4
25 µm bajo Bowman	16956.58 ± 4475.73 (9666.66 a 25133.33)	19353.33 ± 4532.55 (10933.33 a 26400)	0.04
50 µm bajo Bowman	16296.77 ± 4443.65 (9666.66 a 25600)	18442.22 ± 4411.46 (12266.33 a 26866.66)	0.06
Media del flap	16978.22 ± 2835.89 (10688 a 22614.66)	18791.33 ± 3597.93 (12407.33 a 16266.66)	0.03
Lecho estromal	16040.90 ± 3596.67 (9110.66 a 22266.66)	16665.13 ± 3897.19 (12266.60 a 30066.66)	0.5
Estroma medio	19560.88 ± 2502.39 (14000 a 24200)	19016.97 ± 2245.63 (14333.33 a 24066.66)	0.3
Estroma Posterior	18862.96 ± 3094.51 (13400 a 24000)	19406.62 ± 2800.45 (12407.33 a 16266.66)	0.4
Media total	18311.13 ± 2158.70 (14969.11 a 23159.11)	18717.27 ± 2020.92 (16440.74 a 24866.66)	0.4

Los datos se muestran como: media ± desviación estándar (rango) y están expresados como cel/mm³

La densidad de queratocitos en cada grupo y para cada profundidad está representada gráficamente en la figura 30. Encontramos una única significancia estadística en la densidad medida en el flap estromal, siendo la densidad mayor en los operados con LASIK con MK.

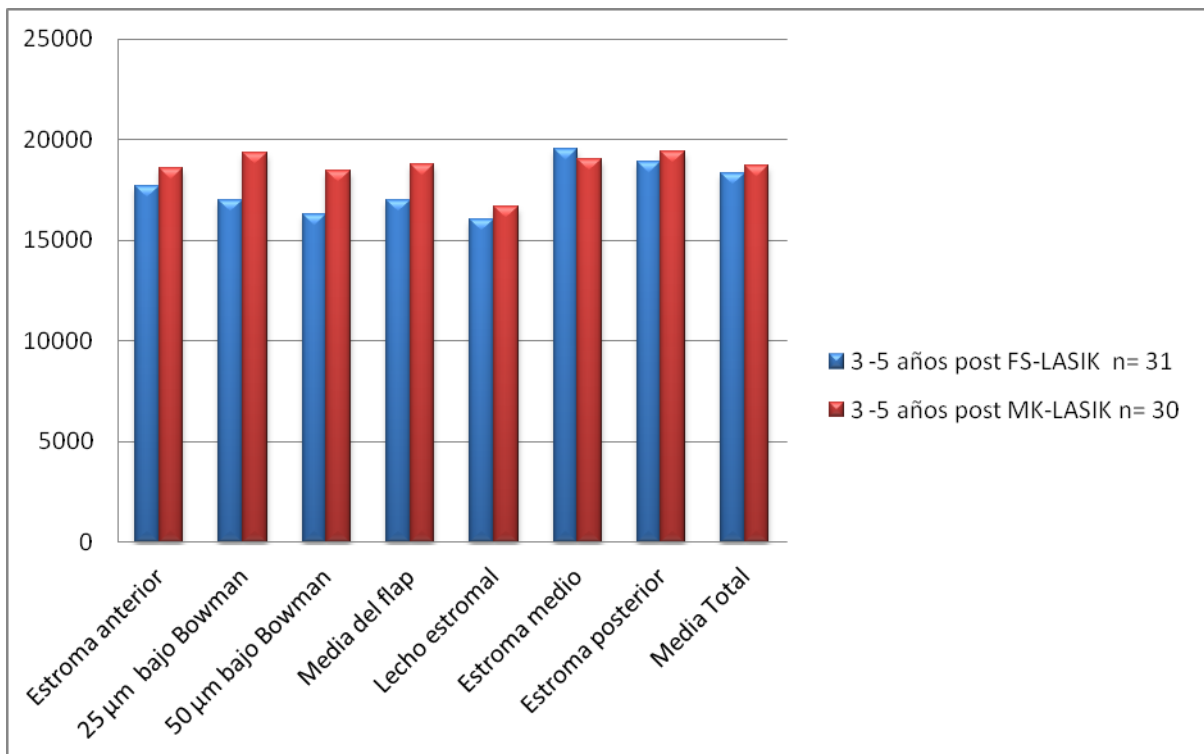


FIGURA 30. Representación de la densidad de queratocitos a los 3-5 años. Comparación FS-LASIK Y MK-LASIK.

7. DISCUSIÓN

7.1 Método para medir la densidad queratocitaria con el microscopio confocal Heidelberg retina Tomograph ii (HRTII) usando el módulo de córnea Rostock (MCR)

En este estudio se realizó la medida de la densidad de queratocitos mediante el conteo manual de los núcleos visibles de éstos con el microscopio confocal HRT II insertándole el MCR y a distintas profundidades de la córnea. En primer lugar seleccionamos la profundidad deseada en las imágenes obtenidas de la córnea completa y seguidamente, en cada profundidad, elegimos un área (siempre el mismo, 400 x 400 μm) para realizar el recuento de los núcleos de los queratocitos y así conocer la densidad celular en esa profundidad. El programa incorporado en el microscopio confocal proporciona la densidad queratocitaria en células por mm^2 .

Debido a que los núcleos de queratocitos reflejan y dispersan una cantidad de luz, éstos son visibles con microscopía confocal y debido a esta reflectividad es posible conocer su densidad mediante el conteo.

A la hora de expresar la densidad queratocitaria, algunos autores la expresan como la media obtenida en distintas imágenes²³⁷, otros la reportan en células por mm^2 y especifican para qué microscopio confocal está calculada.^{108,112,126, 223}

Pero para poder realizar una comparación de la densidad queratocitaria independientemente del microscopio confocal usado, es necesario expresar la densidad celular estromal en células por mm^3 . Para ello fue necesaria la determinación de la profundidad de foco efectiva de nuestro microscopio confocal. El método, conocido como “estereoscópico” consiste básicamente en aplicar una fórmula en la que el número de núcleos brillantes en un área conocida lo dividimos por el volumen de la muestra y

multiplicamos por la profundidad de foco efectiva ($D = N / A\theta$, donde N es el número de células identificadas en el área A, y θ es el espesor de la sección óptica).^{91,100,232}

Para medir la profundidad de foco de nuestro microscopio hemos usado dos métodos. El primero, y el que hemos usado en nuestro análisis, consistió en mover el objetivo del MCR desde la aparición gradual de una célula a la desaparición de ésta. El número de imágenes en las cuales vemos la célula, se multiplica por la distancia media entre imágenes. Para obtener esta medida utilizamos la toma de imágenes automática del HRTII con el MCR y realizamos 3 registros. En cada uno de esos 3 registros automáticos seleccionamos 15 núcleos visibles (45 núcleos de queratocitos en total), obteniendo una profundidad de foco efectiva de $15.63 \pm 1.82 \mu\text{m}$. Una vez obtenida la profundidad de foco, aplicamos la fórmula para obtener la densidad queratocitaria en células por mm^3 .

También medimos la profundidad de campo mediante el método descrito por MacLaren y colaboradores^{100, 235} quienes calculan la profundidad de foco teniendo en cuenta la intensidad del microscopio confocal mediante un método denominado “*fullwidth- at-half-maximum*”. Para obtener la profundidad de foco con este método, medimos la anchura completa de una superficie brillante a la mitad de la intensidad máxima del microscopio confocal. Así, en nuestro trabajo, tomamos imágenes a través de la superficie de un portaobjetos de microscopio, con una distancia entre imágenes de $2\mu\text{m}$, representamos la intensidad media de la señal de retorno y determinamos la anchura completa del portaobjetos a la mitad de esa intensidad máxima. Con este método obtuvimos una profundidad de foco de $13.6 \mu\text{m}$, que no se aleja de la detectada

en el método anterior, y que al realizar el cálculo en células por mm^3 así como el análisis estadístico, obtuvimos los mismos resultados en cada profundidad corneal.

Una vez hemos realizado el cálculo de la densidad queratocitaria en volumen, ésta densidad se puede comparar con la encontrada con distintos microscopios confocales.^{100, 235}

Al comparar los valores de las densidades obtenidas con nuestro microscopio confocal con los estudios publicados, hemos encontrado que la profundidad de foco de nuestro microscopio medida con el método que describió McLaren y colaboradores,²³⁵ difiere significativamente de la que nos proporciona el fabricante ($4\ \mu\text{m}$) y también es distinta a la que se observa en las publicaciones en las que se usa el HRTII con el MCR ($7.6\ \mu\text{m}$ ⁹¹ y $7.8/9.1\ \mu\text{m}$ ²³²) por lo que consideramos importante que cada usuario del HRTII con el MCR calcule la profundidad de foco de su propio dispositivo antes de pasar las medidas de área a volumen.

La conveniencia de expresar las células en volumen en lugar de por unidad de área se debe precisamente la profundidad de foco del microscopio confocal, ya que, al realizar el conteo no sólo podemos observar y contar los núcleos de los queratocitos en un área determinada a una profundidad de la córnea, sino que también podemos observar aquellos que están ligeramente por debajo e introducirlos en el conteo. No obstante se podría hablar de células por mm^2 refiriéndonos a un microscopio confocal en particular, y realizar el análisis estadístico de las comparaciones de densidad queratocitaria con este parámetro, pues al final todos los métodos de pasar de mm^2 a mm^3 se basan en multiplicar el valor original que nos proporciona el microscopio confocal (densidad por mm^2) por una constante.^{91, 234, 235}

7.2 Densidad queratocitaria en población joven candidata a cirugía refractiva corneal.

En nuestro trabajo como media de las capas del estroma anterior (subepitelio, a 25 y 50 μm debajo de la capa de Bowman) en el grupo de pacientes sanos no operados hemos obtenido una densidad queratocitaria de $23666.77 \pm 2621.42 \text{ cel} / \text{mm}^3$ y la densidad en el estroma posterior ha sido de $18439.00 \pm 2139.68 \text{ cel} / \text{mm}^3$. Hemos observado que la densidad queratocitaria disminuye progresivamente desde las capas superficiales del estroma según nos vamos acercando al estroma más posterior, obteniendo las siguientes densidades queratocitarias en cada una de las profundidades de estudio: subepitelio: $29660.71 \pm 5904.80 \text{ cel} / \text{mm}^3$; 25 micras debajo de la capa de Bowman: $21668.19 \pm 3037.24 \text{ cel} / \text{mm}^3$; 50 micras debajo de la capa de Bowman: $19671.42 \pm 2548.61 \text{ cel} / \text{mm}^3$; profundidad correspondiente al lecho estromal (100 micras por debajo de epitelio superficial): $19528.57 \pm 2275.72 \text{ cel} / \text{mm}^3$; estroma medio (200 micras sobre endotelio): $18505.95 \pm 1996.06 \text{ cel} / \text{mm}^3$; estroma posterior (50 micras sobre endotelio): $18439.00 \pm 2139.68 \text{ cel} / \text{mm}^3$.

El gradiente decreciente en la distribución queratocitaria en pacientes sanos no operados también ha sido descrito previamente por Patel y colaboradores¹¹⁵ en su trabajo en el que hace una correlación histológica de la densidad queratocitaria obtenida mediante microscopía confocal. Patel y colaboradores también encuentran que la densidad queratocitaria en el estroma anterior es mayor ($33.050 \text{ cel} / \text{mm}^3$) y esta densidad disminuye al acercarse al estroma posterior ($19.947 \text{ cel} / \text{mm}^3$). Nuestros resultados también coinciden con los encontrados por Tervo y colaboradores¹⁸³ en córneas normales no operadas. Ellos, obtienen una densidad queratocitaria en el estroma anterior que oscila entre 20.000 y 24.000 células por mm^3 y también encuentran una

disminución progresiva de esta densidad al acercarse a las capas más profundas del estroma (19.500 cel / mm³).

Esta distribución celular estromal es perfectamente comparable a la que se obtiene usando tejido corneal escindido y microscopía electrónica y se puede explicar de la siguiente manera: los queratocitos no son células quiescentes y esto se ha demostrado observando la presencia de varios retículos endoplasmáticos, aparato de Golgi, rodeados de diferentes tipos de vesículas en el interior de los mismos. Todos estos orgánulos indican que los queratocitos son células altamente activas y que intervienen en la síntesis del colágeno, almacenamiento de proteínas así como en la creación de la matriz extracelular (el control de esta síntesis es imprescindible para mantener la transparencia corneal). Esta mayor densidad queratocitaria encontrada en el estroma anterior pudiera deberse a que las células de esta región poseen un metabolismo más activo que las del estroma medio y posterior. De hecho, además de encontrar mayor densidad queratocitaria en esta zona del estroma, los queratocitos anteriores poseen más mitocondrias que los posteriores y también se ha observado mayor concentración de proteoglicanos en el estroma anterior que en el posterior.²³⁸

7.3 Medida de la densidad queratocitaria en distintas profundidades en los grupos de pacientes operados con MK- LASIK Y FS-LASIK

Para valorar la reacción queratocitaria tras LASIK decidimos medir la densidad celular en las siguientes profundidades estromales en ambos grupos, MK- LASIK y FS-LASIK: estroma anterior (primera imagen bajo epitelio), a 25 y 50 micras por debajo de la capa de Bowman, en el lecho estromal (justo debajo de la interfase del flap), en el estroma medio (200 µm sobre el endotelio corneal) y a 50 µm sobre el endotelio corneal.

Obteniendo así 6 medidas de densidad queratocitaria a diferentes profundidades del estroma corneal en cada grupo de estudio. Además hemos obtenido la densidad queratocitaria promedio en el flap, realizando la media entre las densidades obtenidas en subepitelio, a 25 y 50 micras debajo de la capa de Bowman. También calculamos la densidad celular global de la córnea, calculando la media entre las densidades celulares del estroma anterior (media del flap +lecho estromal), el estroma medio y el estroma posterior.

En el grupo control de córneas no operadas, las profundidades a las que medimos la densidad queratocitaria fueron las mismas que las usadas en los grupos MK-LASIK y FS-LASIK con el fin de hacer la comparación en profundidades semejantes y observar si éstas se desviaban de la normalidad. Con esta finalidad, la medida del “lecho estromal” en el grupo control la hicimos de la siguiente forma: calculamos la profundidad de ablación media realizada en cada uno de los grupos. Teniendo en cuenta que la refracción media fue de -1.88 D de esfera, y -0.96 D de cilindro, calculamos de acuerdo a los parámetros de ablación de nuestro láser, y obtuvimos que la ablación estromal media fue de 40 μm . A esta cantidad le sumamos el grosor del flap estimado (110 μm) y obtuvimos que la región estromal más aproximada en cuanto a profundidad al lecho estromal de los pacientes intervenidos con técnicas de flap, sería la densidad queratocitaria a 150 μm de profundidad con respecto a la línea epitelial anterior en el grupo control. Por tanto, esta fue la profundidad que se utilizó para comparar la densidad celular del lecho estromal de los grupos MK-LASIK y FS-LASIK con la de los ojos control.

La elección de estas profundidades para el examen confocal la hicimos teniendo en cuenta la respuesta que se produce tras la cirugía LASIK (cicatriz no fibrótica e hipocelular caracterizada por una densidad de queratocitos disminuida y localizada en la

interfase).¹⁴³ Conviene resaltar que la respuesta celular en el estroma posterior tras este tipo de cirugías aún no está muy clara.

Un daño focal en el epitelio corneal induce una pérdida de queratocitos en el estroma anterior por apoptosis, seguida de proliferación celular, transformación de queratocitos en células tipo “fibroblasto” con capacidad de generar cicatriz estromal, repoblación celular de la región afecta, seguida de una normalización gradual de la densidad queratocitaria y remodelación del colágeno estromal.¹⁴³

Tras LASIK con MK, se ha encontrado una cicatriz hipocelular en capas anteriores localizadas cerca de la ablación láser, es por este motivo que elegimos registrar una medida justo bajo el epitelio. También se ha descrito una disminución de queratocitos en el flap tras la cirugía, y por este motivo decidimos medir la densidad queratocitaria en el flap estromal (a 25 micras y a 50 micras bajo la capa Bowman).¹¹⁶ Sin embargo, en el estroma posterior parece existir un aumento en la densidad de queratocitos, y por este motivo elegimos medir las densidades en el estroma medio y posterior.^{126,178,225}

Tras el láser FS no existen estudios publicados en humanos a largo plazo que valoren los cambios en la densidad de queratocitos y por tanto, para conocer la distribución queratocitaria y la relación que pudiera tener esta distribución en el proceso de curación tras el uso del láser de FS en la cirugía LASIK, decidimos medir la densidad queratocitaria en las mismas profundidades que en el grupo operado con MK y comparar las respuestas de cada grupo entre ellas.

Se han descrito densidades de queratocitos disminuidas en casos de córneas con queratocono así como en usuarios de lentes de contacto, y se han visto distribuciones no homogéneas de los mismos a diversas profundidades estromales tras LASIK y tras

ectasia post LASIK, por lo que la distribución homogénea de la densidad de queratocitos en la córnea pudiera ser un factor preventivo de complicaciones tras cirugía refractiva y frente a patologías corneales, por tanto, la evaluación de la densidad celular estromal en distintas profundidades puede ser un dato muy importante para la prevención y seguimiento de determinadas patologías y/o complicaciones.^{116, 222, 231, 233}

7.4 Densidad queratocitaria tras MK LASIK y TRAS FS LASIK

En general, los resultados de nuestro trabajo muestran una reorganización de la celularidad estromal después de LASIK. A los tres meses de la cirugía, se produce un aumento en la densidad queratocitaria estromal total de la córnea debido a un aumento en el estroma medio y posterior en ambas cirugías, así como un aumento en el lecho estromal solo en el grupo LASIK con MK. A los 15 meses de ambas cirugías, hemos encontrado una tendencia hacia la normalización de la densidad celular en las capas mencionadas anteriormente (lecho estromal, estroma medio y posterior) y una depleción queratocitaria en el flap estromal y en el lecho estromal. A partir de los 15 meses, la densidad queratocitaria se ha mantenido estable hasta los 3-5 años de la cirugía, y aunque hemos encontrado una disminución celular estromal en el flap, la media total de queratocitos en toda la córnea no ha disminuido significativamente al compararla con el grupo control de ojos no operados.

Los cambios en la densidad celular total de la córnea, muestran un patrón similar en ambos grupos y no hemos encontrado diferencias significativas entre el empleo del MK o del láser FS para crear el flap en ninguna de las revisiones posteriores a la cirugía

3 meses después de las cirugías

Hemos encontrado un aumento en la población queratocitaria estromal celular a los 3 meses de la cirugía debido a un aumento de la densidad celular en las siguientes

capas: estroma medio, estroma posterior, y la media del flap estromal en ambos grupos. Además, en el grupo MK-LASIK este aumento se observó también en el lecho estromal.

Se ha descrito un aumento en la densidad queratocitaria en las capas más profundas del estroma tras cirugía de superficie y tras LASIK con MK.^{126,178,225} La explicación del hecho de que a los 3 meses de la cirugía no exista una disminución (sino un aumento) de la densidad de queratocitos en el flap aún no se conoce, pero puede ser consistente con la hipótesis que indica que tras un daño en la córnea existe una apoptosis inicial de queratocitos alrededor del tejido dañado y esto desencadena una respuesta de repoblación celular. Vesaluoma y colaboradores¹²⁷ describen que a los 6 meses de la cirugía LASIK con MK la densidad de queratocitos disminuye un 60% en el flap estromal encontrándose un aumento en esta capa antes de los 6 meses después de la cirugía. Después de LASIK con MK, esta repoblación parece ocurrir no solo en el lecho estromal sino también en el área que rodea al tejido dañado, en el flap estromal y en capas más profundas.

Respuesta a largo plazo

A los 15 meses tras la cirugía LASIK con MK y FS, hemos encontrado una tendencia hacia la normalización de la densidad queratocitaria en el estroma medio y en el posterior. Es decir, una disminución de la densidad celular que se había alcanzado a los tres meses de la cirugía, hasta alcanzar valores comparables con los del grupo control. Sin embargo en el flap y en el lecho estromal hemos encontrado una depleción queratocitaria relativa estadísticamente significativa comparada con la densidad celular a estos niveles en el grupo control de córneas no operadas. A partir de los 15 meses, la densidad queratocitaria se ha mantenido estable en todos los estratos corneales estudiados hasta los 3-5 años de la cirugía en ambos grupos.

Coincidiendo con nuestros resultados tras la cirugía LASIK con MK, Erie y colaboradores¹¹⁶ encuentran en su estudio realizado con córneas in vivo una disminución de la densidad de queratocitos en el flap estromal y en el lecho estromal, desde el primer año hasta los 5 años. Además encuentran una depleción queratocitaria en el flap y en el lecho estromal a partir del año de la cirugía. En la zona posterior a la ablación y en el estroma más posterior la disminución la refieren a partir de los 5 años de la cirugía LASIK con MK, pero no encuentran esta disminución antes.

No hemos encontrado estudios previos en humanos que traten los cambios en la población queratocitaria después de LASIK con FS a largo plazo. Sin embargo los efectos a corto plazo del láser FS en la población corneal celular han sido objeto de varios estudios en animales en los que a las 24 horas de realizar el corte con el FS se ha detectado necrosis celular, seguido de infiltración de células inflamatorias y una replicación de los queratocitos.^{167,230} En estos trabajos, se hace un estudio del tipo de muerte celular (apoptosis o necrosis) que tiene lugar tras el uso del láser FS y del MK. A las 24 horas muestran indicativos de muerte celular por necrosis con ambas técnicas, tanto en el estroma central anterior como en el periférico. Al realizar el flap con el láser de FS de 15 KHz la muerte celular predominante fue la necrosis y la presencia de éste tipo de muerte celular era más prevalente en estos ojos que en el grupo de MK. Parece que los láseres de FS con mayores frecuencias (30 y 60 KHz) producirían un grado de necrosis celular similar al MK.

MK vs FS

El láser FS de baja frecuencia, por tanto, parece inducir más grado de necrosis celular comparado con el que induce el MK, y debido a que esta muerte celular es más agresiva (al extravasar los contenidos celulares fuera del espacio celular, al contrario

que ocurre con la apoptosis), la respuesta inflamatoria que provoca en el estroma circundante es más intensa. Esto significa que sería de esperar un aumento en la proliferación de queratocitos y también en el grado de infiltración de células inflamatorias en el estroma corneal cuando se usan láseres de FS con altos niveles de energía con respecto a cuándo se utiliza el MK.^{141,174,231}

La muerte celular y la respuesta inflamatoria que suceden tras la cirugía LASIK en la córnea central realizada con el láser de FS y con niveles de energía bajos, (como el que usamos en nuestro estudio de 60 KHz) no son significativamente diferentes si las comparamos con las que tienen lugar tras el empleo del MK. Aunque sí se ha descrito más replicación queratocitaria con el FS y estos niveles de energía (60 kHz) en los bordes del flap.¹⁴¹ Netto y colaboradores¹⁶⁷ y Medeiros y colaboradores,¹⁷¹ describieron que los flaps generados con el MK y con cada modelo de láser FS (15KHz, 30KHz y 60 KHz) presentaban un indicativo de mitosis en la periferia de la córnea a las 24 horas de la cirugía (presencia del antígeno Ki67), y además en la córnea central cuando se usaba el láser de 15 KHz. Estos autores, localizan las principales diferencias entre el empleo del láser FS o MK cerca del margen del flap donde encontraron el doble de células en proceso de mitosis con el láser FS de 15 KHz que con el MK. Esta mitosis se reducía significativamente en la periferia corneal cuando se usaba el láser de FS de 30 KHz comparado con el de 15 KHz, pero la mitosis celular aún seguía siendo mayor que con el MK. Sin embargo, cuando se comparaba la mitosis ocurrida con el láser de 60KHz no se encontraron diferencias significativas con la respuesta encontrada en los flaps obtenidos con MK en la córnea central. Aunque, la mitosis seguía siendo mayor en la periferia corneal cuando se empleaba el láser FS.^{167,171}

En contraposición a lo anteriormente descrito, en nuestro trabajo encontramos un aumento de la densidad queratocitaria en el lecho estromal a los 3 meses de la cirugía LASIK realizada con FS, pero éste aumento no era estadísticamente significativo comparado con el grupo de córneas no operadas. Sin embargo, tras el uso del MK, el aumento de la densidad a los 3 meses si fue significativamente mayor. Esta diferencia respecto a la literatura puede deberse a que en nuestro trabajo hemos medido la densidad queratocitaria en la córnea central y no hemos detectado las diferencias que pudiesen existir en el margen del flap tras el uso del FS y MK.^{167,171} Otro factor que podría jugar un papel importante en el hecho de no encontrar mayor proliferación celular tras el uso del FS que tras el uso del MK puede ser el régimen esteroideo que han seguido los pacientes operados bajo la técnica LASIK con FS. En nuestro trabajo los pacientes operados con FS siguieron un tratamiento postoperatorio que consistió en esteroides tópicos (dexametasona 1 mg/mL) aplicados 8 veces al día durante la primera semana y para el grupo MK los esteroides se aplicaron 4 veces al día durante la primera semana. Sin embargo, varios estudios, como el realizado por Netto y colaboradores¹⁶⁷ describen que el régimen de tratamiento esteroideo post operatorio no influye de forma significativa en la modulación o replicación celular que ocurre después del LASIK con FS. De hecho, estos autores observaron que los esteroides tópicos no ejercían influencia significativa en el grado de mitosis celular ni el de infiltración de células inflamatorias tras la aplicación de los distintos láseres de FS y el MK. Además, Petroll y colaboradores¹⁸⁸ encontraron que tras el uso del láser FS de 60-kHz y creando dos grupos de tratamiento esteroideo postquirúrgico (en uno de ellos la pauta era de una gota cada hora durante 1 día, seguida de 4 veces al día durante 7 días, y en el otro era cada hora durante 1 día y 4 veces al día durante 4 semanas), la activación queratocitaria seguía presente en el grupo con el régimen esteroideo menor, y no encontraron

diferencias significativas en la densidad de queratocitos entre los dos grupos, utilizando en ambos el mismo láser con la misma energía. Por lo que el tratamiento esteroideo postoperatorio parece ejercer escasa influencia en la replicación queratocitaria que sucede tras este tipo de cirugías.

En los estudios en animales en los que se ha usado el láser de FS sin corte lamelar, sin levantar el flap o sin la ablación con láser excímer posterior, no se ha descrito una activación significativa de los queratocitos.¹⁸⁵ Cuando el corte se realiza con el MK y no se usa el láser excímer posteriormente, hemos encontrado en la literatura un estudio realizado por Twa y colaboradores²³⁶ en ojos de conejo en el que no encuentran cambios en la población queratocitaria a las 6 semanas después de las cirugías, aunque si muestran que la densidad queratocitaria corneal después del corte era mayor que antes, especialmente en el flap estromal.

Podríamos afirmar que si la principal causa de la respuesta queratocitaria fuera el epitelio dañado (debido a la interacción entre epitelio-estroma), y posiblemente la posterior ablación con el láser excimer, no debería haber diferencias entre LASIK con MK y FS a largo plazo.

Consecuencias de la depleción queratocitaria

La causa de la subsecuente pérdida o disminución de la densidad de queratocitos en el flap estromal y en el lecho estromal aún se desconoce. En nuestro trabajo ninguno de los pacientes ha mostrado cambios que sugieran una posible ectasia post-LASIK. Así pues, las consecuencias de la depleción en el flap estromal y en el lecho estromal no están muy claras y deben ser objeto de posteriores investigaciones. Ali Javadi y colaboradores²³³ mostraron una depleción queratocitaria similar después de LASIK tanto en córneas que habían desarrollado ectasia postoperatoria como en córneas que

habían seguido un postoperatorio completamente normal y no habían desarrollado ectasia post LASIK.

Nuestros resultados muestran que incluso habiendo una disminución de la densidad de queratocitos en el flap, la densidad celular corneal total se mantiene estable. Por otro lado podemos afirmar que la posibilidad de que el estroma corneal sea repoblado por células derivadas de la médula ósea hace pensar que sea difícil una verdadera disminución de la densidad de queratocitos muchos años después de la cirugía.²³⁸

7.5 Limitaciones de nuestro trabajo

Las limitaciones del uso del microscopio confocal para obtener la densidad de queratocitos pueden afectar a nuestros resultados. Estas limitaciones son: la posibilidad de que el sujeto se mueva hacia adelante o hacia atrás al tomar las imágenes de la córnea completa con el microscopio confocal y por otro lado la subjetividad que tiene el conteo manual de las células. Para minimizar la primera fuente de error hemos tomado 3 imágenes de cada ojo completas, y hemos seleccionado la imagen de la córnea completa que presentaban menos artefactos de movimiento. Por otro lado, para eliminar al máximo la subjetividad, todas las imágenes así como el conteo celular han sido obtenidas y realizadas por la misma persona, la cual estaba enmascarada respecto al tipo de cirugía que se le había realizado al paciente.²³⁵

Con relación a la subjetividad en el conteo celular, existe un estudio publicado por McLaren y colaboradores²³⁴ en el que se compara la densidad de queratocitos medida manualmente con la obtenida mediante un programa de procesamiento de imágenes que desarrollaron para obtener la densidad de queratocitos de forma automática. El programa identifica y selecciona lo que considera que corresponde a

núcleos celulares y aplica un algoritmo complejo mediante el cual se obtiene la densidad de queratocitos. Aunque hubo diferencias en cuanto a las medidas de las densidades entre la forma manual y la automática, las conclusiones respecto a los cambios celulares estromales tras las cirugías fueron los mismos. En este trabajo que se realizó con un microscopio confocal de barrido en hendidura, se indica que la subjetividad del conteo manual puede estar causada por el bajo contraste que existía entre los núcleos de los queratocitos y el fondo en el que se encontraban ya que a veces carecía de una buena resolución y contraste. Sin embargo, las imágenes que se obtienen con el microscopio confocal de barrido láser HRTII son de alto contraste con lo que se debiera disminuir la variabilidad en el conteo manual.^{234,235}

8. CONCLUSIONES

- 1) Hemos desarrollado un sistema que es capaz de evaluar la densidad queratocitaria en volumen con el microscopio confocal Heidelberg Retina Tomograph II (HRTII) usando el módulo de córnea Rostock (MCR).
- 2) La población control tiene una densidad queratocitaria con un gradiente decreciente desde las capas más superficiales del estroma a las más profundas, lo cual se asemeja con lo previamente reportado en la literatura.
- 3) La densidad de queratocitos en el estroma medio y posterior aumenta significativamente a los 3 meses de la cirugía MK-LASIK y FS LASIK con respecto al grupo control.
- 4) La densidad de queratocitos aumenta significativamente en el lecho estromal a los 3 meses de la cirugía MK-LASIK comparándolo con el grupo control.
- 5) La densidad de queratocitos aumenta significativamente en el flap estromal a los 3 meses de la cirugía MK-LASIK y FS LASIK comparándolo con el grupo control.
- 6) La densidad de queratocitos en el flap estromal disminuye significativamente a los 15 meses de las cirugías MK-LASIK y FS-LASIK comparada con el grupo control, y esta disminución se mantiene al menos hasta los 3-5 años.
- 7) La densidad de queratocitos en el lecho estromal disminuye significativamente a los 15 meses de las cirugías MK-LASIK y FS-LASIK comparada con el grupo control y esta disminución se mantiene al menos hasta los 3-5 años.
- 8) La carga celular corneal total no muestra cambios significativos en las exploraciones postoperatorias a partir de los 15 meses tras la cirugía LASIK

con MK y LASIK con FS comparada con el grupo control, aun mostrando una depleción significativa en el flap estromal. Lo cual es compatible con que cuando hay una disminución celular en las capas anteriores, hay un aumento en el estroma posterior y viceversa.

- 9) Aun encontrando diferencias significativas en algunas capas celulares entre cirugías MK LASIK y FS LASIK, la carga celular total no mostró diferencias significativas entre cirugías en ninguna de las revisiones postoperatorias.

9. CONCLUSIONS

- 1) We have developed a capable system to evaluate the keratocyte density with confocal microscopy Heidelberg Retina Tomograph II (HRTII) and Rostock cornea module (RCM).
- 2) Control group has a decreasing gradient keratocyte density from the upper layers to the deeper stroma, which has been reported previously in the literature.
- 3) There is significant increase in keratocyte density in mid and posterior stroma at 3 months after MK-LASIK and FS LASIK surgeries.
- 4) There is significant increase in keratocyte density in stromal bed at 3 months after MK-LASIK surgery.
- 5) There is significant increase in keratocyte density in stromal flap at 3 months after MK-LASIK and FS LASIK surgeries.
- 6) There is significant keratocyte depletion in stromal flap 15 months after MK-LASIK and FS-LASIK surgeries compared with control groups, and this depletion is maintained up to 5 years after surgeries.
- 7) Keratocyte density in stromal flap decrease at 15 months after MK-LASIK and FS LASIK compared with control groups and this depletion is maintained up to 5 years after surgeries.
- 8) There is no depletion in total cellular average after MK-LASIK and FS-LASIK compared with control group 15 months after surgeries compared

with control group and this depletion is maintained up to 5 years after surgeries.

- 9) We haven't found differences in total keratocyte density between FS LASIK and MK LASIK in any post operative visit instead we found an irregular cellular distribution between surgeries.

ANEXO I

Las publicaciones que se han derivado hasta el momento de esta Tesis doctoral son:

- de Benito Llopis L, Drake P, Cañadas P, Hernández-Verdejo JL, Teus MA.
Keratocyte Density after Laser-Assisted Subepithelial Keratectomy with Mitomycin C. Am J Ophthalmol. 2010 Nov; 150(5):642-649
- de Benito-Llopis L, Cañadas P, Drake P, Hernández-Verdejo JL, Teus MA.
Keratocyte Density 3 Months, 15 Months, and 3 Years After Corneal Surface Ablation With Mitomycin C. Am J Ophthalmol. 2012 Jan; 153(1):17-23.
- Cañadas P, de Benito Llopis L, Hernández-Verdejo JL, Teus MA. Comparison of keratocyte density after femtosecond laser vs mechanical microkeratome from 3 months up to 5 years after LASIK. Graefe's Archive for Clinical and Experimental Ophthalmology 2013 Sept; 251(9): 2171-2179.

ANEXO II

Aprobación del comité ético del Hospital Universitario de la Princesa de la comunidad de Madrid.

COMITÉ ÉTICO DE INVESTIGACIÓN CLÍNICA

Madrid, 26 de septiembre de 2011

El Comité Ético de Investigación Clínica del Hospital Universitario de la Princesa en su reunión del día 22-09-11 (acta 16/11) evaluó la respuesta a las aclaraciones solicitadas del proyecto de investigación:

TÍTULO: Estudio de la densidad queratocitaria con microscopia confocal tras cirugía refractiva

Nº de Registro: PI-547

Investigador principal: Pilar Cañadas (Clínica Visum Madrid)

Ponentes: F. Abad, A. López

Decisión tomada: Aprobación (22-09-11)

Este Comité Ético de Investigación Clínica considera que tanto el proyecto de investigación como la Hoja de información al paciente y consentimiento informado son **ética y metodológicamente aceptables**. Asimismo, considera que los investigadores son competentes para llevar a cabo este proyecto.


Fdo: Dra. Mª de Mar Ortega Gómez
Secretaria del C.E.I.C

10. BIBLIOGRAFÍA

- (1) Krachmer JH MM, Holland EJ. Cornea. Fundamentals of cornea and external disease. Sant Lous: Mosby; 1997.

- (2) Freegard TJ. The physical basis of transparency of the normal cornea. *Eye (Lond)* 1997;11 :465-471.
- (3) Mishima S. Corneal thickness. *Surv Ophthalmol* 1968 Sep;13(2):57-96.
- (4) Rozsa AJ, Beuerman RW. Density and organization of free nerve endings in the corneal epithelium of the rabbit. *Pain* 1982 Oct;14(2):105-120.
- (5) Muller LJ, Marfurt CF, Kruse F, Tervo TM. Corneal nerves: structure, contents and function. *Exp Eye Res* 2003 May;76(5):521-542.
- (6) Weissman BA, Fatt I, Rasson J. Diffusion of oxygen in human corneas in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1981 Jan;20(1):123-125.
- (7) Holly FJ, Lemp MA. Tear physiology and dry eyes. *Surv Ophthalmol* 1977 Sep-Oct;22(2):69-87.
- (8) van Setten GB, Viinikka L, Tervo T, Pesonen K, Tarkkanen A, Perheentupa J. Epidermal growth factor is a constant component of normal human tear fluid. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1989;227(2):184-187.
- (9) Konomi H, Hayashi T, Nakayasu K, Arima M. Localization of type V collagen and type IV collagen in human cornea, lung, and skin. Immunohistochemical evidence by anti-collagen antibodies characterized by immunoelectroblotting. *Am J Pathol* 1984 Sep;116(3):417-426.
- (10) Nakayasu K, Tanaka M, Konomi H, Hayashi T. Distribution of types I, II, III, IV and V collagen in normal and keratoconus corneas. *Ophthalmic Res* 1986;18(1):1-10.
- (11) Friedenwald JS, Buschke W. Some Factors Concerned in the Mitotic and Wound-Healing Activities of the Corneal Epithelium. *Trans Am Ophthalmol Soc* 1944;42:371-383.
- (12) Kaufman PL, Alm A. Adler Fisiología del Ojo. 10th ed.: Eselvier España S.A.; 2004.

- (13) Hogan M, Alvarado J, Weddel E. Histology of the Human Eye. Philadelphia: Philadelphia; 1971.
- (14) Daniels JT, Harris AR, Mason C. Corneal epithelial stem cells in health and disease. Stem Cell Rev 2006;2(3):247-254.
- (15) Thoft RA, Friend J. The X, Y, Z hypothesis of corneal epithelial maintenance. Invest Ophthalmol Vis Sci 1983 Oct;24(10):1442-1443.
- (16) Thoft RA, Friend J, Kenyon KR. Ocular surface response to trauma. Int Ophthalmol Clin 1979 Summer;19(2):111-131.
- (17) Buck RC. Measurement of centripetal migration of normal corneal epithelial cells in the mouse. Invest Ophthalmol Vis Sci 1985 Sep;26(9):1296-1299.
- (18) Schermer A, Galvin S, Sun TT. Differentiation-related expression of a major 64K corneal keratin in vivo and in culture suggests limbal location of corneal epithelial stem cells. J Cell Biol 1986 Jul;103(1):49-62.
- (19) Dua HS, Miri A, Alomar T, Yeung AM, Said DG. The role of limbal stem cells in corneal epithelial maintenance: testing the dogma. Ophthalmology 2009 May;116(5):856-863.
- (20) Maurice D. The cornea and sclera. New York; 1984.
- (21) Marshall GE, Konstas AG, Lee WR. Immunogold fine structural localization of extracellular matrix components in aged human cornea. I. Types I-IV collagen and laminin. Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol 1991;229(2):157-163.
- (22) Komai Y, Ushiki T. The three-dimensional organization of collagen fibrils in the human cornea and sclera. Invest Ophthalmol Vis Sci 1991 Jul;32(8):2244-2258.
- (23) Marshall GE, Konstas AG, Lee WR. Collagens in ocular tissues. Br J Ophthalmol 1993 Aug;77(8):515-524.
- (24) Wilson SE, Netto M, Ambrosio R, Jr. Corneal cells: chatty in development, homeostasis, wound healing, and disease. Am J Ophthalmol 2003 Sep;136(3):530-536.

- (25) Jester JV. Corneal crystallins and the development of cellular transparency. *Semin Cell Dev Biol* 2008 Apr;19(2):82-93.
- (26) Scott JE, Bosworth TR. The comparative chemical morphology of the mammalian cornea. *Basic Appl Histochem* 1990;34(1):35-42.
- (27) Liu J, Roberts CJ. Influence of corneal biomechanical properties on intraocular pressure measurement: quantitative analysis. *J Cataract Refract Surg* 2005 Jan;31(1):146-155.
- (28) Medeiros FA, Weinreb RN. Evaluation of the influence of corneal biomechanical properties on intraocular pressure measurements using the ocular response analyzer. *J Glaucoma* 2006 Oct;15(5):364-370.
- (29) Buzard KA. Introduction to biomechanics of the cornea. *Refract Corneal Surg* 1992 Mar-Apr;8(2):127-138.
- (30) Glass DH, Roberts CJ, Litsky AS, Weber PA. A viscoelastic biomechanical model of the cornea describing the effect of viscosity and elasticity on hysteresis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2008 Sep;49(9):3919-3926.
- (31) Nishida T, Tanaka T. Extracellular matrix and growth factors in corneal wound healing. *Curr Opin Ophthalmol* 1996 Aug;7(4):2-11.
- (32) Estil S, Primo EJ, Wilson G. Apoptosis in shed human corneal cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000 Oct;41(11):3360-3364.
- (33) Johnson DH, Bourne WM, Campbell RJ. The ultrastructure of Descemet's membrane. I. Changes with age in normal corneas. *Arch Ophthalmol* 1982 Dec;100(12):1942-1947.
- (34) Tamura Y, Konomi H, Sawada H, Takashima S, Nakajima A. Tissue distribution of type VIII collagen in human adult and fetal eyes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1991 Aug;32(9):2636-2644.

- (35) Nakagawa T, Maeda N, Okazaki N, Hori Y, Nishida K, Tano Y. Ultrasound biomicroscopic examination of acute hydrops in patients with keratoconus. *Am J Ophthalmol* 2006 Jun;141(6):1134-1136.
- (36) Obata H, Tsuru T. Corneal wound healing from the perspective of keratoplasty specimens with special reference to the function of the Bowman layer and Descemet membrane. *Cornea* 2007 Oct;26(9 Suppl 1):S82-9.
- (37) Hedbys BO, Mishima S. The thickness-hydration relationship of the cornea. *Exp Eye Res* 1966 Jul;5(3):221-228.
- (38) Cheng H, Bates AK, Wood L, McPherson K. Positive correlation of corneal thickness and endothelial cell loss. Serial measurements after cataract surgery. *Arch Ophthalmol* 1988 Jul;106(7):920-922.
- (39) Krachmer J, Mannis M, Holland E. Schallhorn S. *Refractive Surgery: past, present, and future*. . 2^a ed. Philadelphia: Elsevier Mosby; 2005. p. 1873-1892.
- (40) SATO T, AKIYAMA K, SHIBATA H. A new surgical approach to myopia. *Am J Ophthalmol* 1953 Jun;36(6:1):823-829.
- (41) Fyodorov SN, Sarkizova MB, Kurasova TP. Corneal biomicroscopy following repeated radial keratotomy. *Ann Ophthalmol* 1983 May;15(5):403-407.
- (42) Rowsey JJ, Fouraker BD. Corneal coupling principles. *Int Ophthalmol Clin* 1996 Fall;36(4):29-38.
- (43) Faktorovich EG, Maloney RK, Price FW,Jr. Effect of astigmatic keratotomy on spherical equivalent: results of the Astigmatism Reduction Clinical Trial. *Am J Ophthalmol* 1999 Mar;127(3):260-269.
- (44) Budak K, Friedman NJ, Koch DD. Limbal relaxing incisions with cataract surgery. *J Cataract Refract Surg* 1998 Apr;24(4):503-508.
- (45) Price FW, Grene RB, Marks RG, Gonzales JS. Astigmatism reduction clinical trial: a multicenter prospective evaluation of the predictability of arcuate keratotomy.

Evaluation of surgical nomogram predictability. ARC-T Study Group. Arch Ophthalmol 1995 Mar;113(3):277-282.

(46) Seiler T, Matallana M, Bende T. Laser thermokeratoplasty by means of a pulsed holmium:YAG laser for hyperopic correction. Refract Corneal Surg 1990 Sep-Oct;6(5):335-339.

(47) Koch DD, Kohnen T, McDonnell PJ, Menefee R, Berry M. Hyperopia correction by noncontact holmium:YAG laser thermal keratoplasty: U.S. phase IIA clinical study with 2-year follow-up. Ophthalmology 1997 Nov;104(11):1938-1947.

(48) Chen SS, Humphrey JD. Heat-induced changes in the mechanics of a collagenous tissue: pseudoelastic behavior at 37 degrees C. J Biomech 1998 Mar;31(3):211-216.

(49) McDonald MB, Hersh PS, Manche EE, Maloney RK, Davidorf J, Sabry M. Conductive keratoplasty for the correction of low to moderate hyperopia: U.S. clinical trial 1-year results on 355 eyes. Ophthalmology 2002 Nov;109(11):1978-89; discussion 1989-90.

(50) Esquenazi S, He J, Kim DB, Bazan NG, Bui V, Bazan HE. Wound-healing response and refractive regression after conductive keratoplasty. J Cataract Refract Surg 2006 Mar;32(3):480-486.

(51) Barraquer JI. Autokeratoplasty with optical carving for the correction of myopia (Keratomileusis). An Med Espec 1965 Mar;51(1):66-82.

(52) Troutman RC, Swinger C. Refractive keratoplasty: keratophakia and keratomileusis. Trans Am Ophthalmol Soc 1978;76:329-339.

(53) Barraquer JI. Keratomileusis for myopia and aphakia. Ophthalmology 1981 Aug;88(8):701-708.

(54) Swinger CA, Barraquer JI. Keratophakia and keratomileusis--clinical results. Ophthalmology 1981 Aug;88(8):709-715.

(55) Friedlander MH, Rich LF, Werblin TP, Kaufman HE, Granet N. Keratophakia using preserved lenticules. Ophthalmology 1980 Jul;87(7):687-692.

- (56) McDonald MB, Kaufman HE, Aquavella JV, Durrie DS, Hiles DA, Hunkeler JD, Keates RH, Morgan KS, Sanders DR. The nationwide study of epikeratophakia for myopia. *Am J Ophthalmol* 1987 Mar 15;103(3 Pt 2):375-383.
- (57) Lyle WA, Jin GJ. Initial results of automated lamellar keratoplasty for correction of myopia: one year follow-up. *J Cataract Refract Surg* 1996 Jan-Feb;22(1):31-43.
- (58) Esquenazi S. Comparison of laser in situ keratomileusis and automated lamellar keratoplasty for the treatment of myopia. *J Refract Surg* 1997 Nov-Dec;13(7):637-643.
- (59) Boyd B, Agarwal S, Agarwal A. Entendiendo los laser refractivos. In: Agarwal A, editor. *LASIK: presente y futuro*. Panamá: Highlights of Ophthalmology; 2001. p. 1-8.
- (60) Trokel SL, Srinivasan R, Braren B. Excimer laser surgery of the cornea. *Am J Ophthalmol* 1983 Dec;96(6):710-715.
- (61) Puliafito CA, Stern D, Krueger RR, Mandel ER. High-speed photography of excimer laser ablation of the cornea. *Arch Ophthalmol* 1987 Sep;105(9):1255-1259.
- (62) Krueger RR, Trokel SL, Schubert HD. Interaction of ultraviolet laser light with the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1985 Nov;26(11):1455-1464.
- (63) Oshika T, Klyce SD, Smolek MK, McDonald MB. Corneal hydration and central islands after excimer laser photorefractive keratectomy. *J Cataract Refract Surg* 1998 Dec;24(12):1575-1580.
- (64) Krueger RR, Saedy NF, McDonnell PJ. Clinical analysis of steep central islands after excimer laser photorefractive keratectomy. *Arch Ophthalmol* 1996 Apr;114(4):377-381.
- (65) Probst L, Woolfson J, Kritzinger M. Fórmulas predictivas para LASIK. In: Boyd B, Agarwal S, Agarwal A, editors. *LASIK: presente y futuro*. Panamá: Highlights of Ophthalmology; 2001. p. 65-73.
- (66) Pettit GH. The Alcon/Summit/Autonomous perspective on fixed vs. variable spot ablation. *J Refract Surg* 2001 Sep-Oct;17(5):S592-3.

- (67) Fiore T, Carones F, Brancato R. Broad beam vs. flying spot excimer laser: refractive and videokeratographic outcomes of two different ablation profiles after photorefractive keratectomy. *J Refract Surg* 2001 Sep-Oct;17(5):534-541.
- (68) Gobbi PG, Carones F, Brancato R, Carena M, Fortini A, Scagliotti F, Morico A, Venturi E. Automatic eye tracker for excimer laser photorefractive keratectomy. *J Refract Surg* 1995 May-Jun;11(3 Suppl):S337-42.
- (69) Pallikaris I, McDonald MB, Siganos D, Klonos G, Detorakis S, Frey R, Downes R, Gauthier CA. Tracker-assisted photorefractive keratectomy for myopia of -1 to -6 diopters. *J Refract Surg* 1996 Feb;12(2):240-247.
- (70) Munnerlyn CR, Koons SJ, Marshall J. Photorefractive keratectomy: a technique for laser refractive surgery. *J Cataract Refract Surg* 1988 Jan;14(1):46-52.
- (71) Shah S, Sebai Sarhan AR, Doyle SJ, Pillai CT, Dua HS. The epithelial flap for photorefractive keratectomy. *Br J Ophthalmol* 2001 Apr;85(4):393-396.
- (72) Azar D. Laser Assisted Subepithelial keratomileusis (LASEK). In: Krachmer J, Mannis M, Holland E, editors. *Cornea*. 2^a ed. Philadelphia: Elsevier Mosb; 2005. p. 1973-1892.
- (73) Scerrati E. Laser in situ keratomileusis vs. laser epithelial keratomileusis (LASIK vs. LASEK). *J Refract Surg* 2001 Mar-Apr;17(2 Suppl):S219-21.
- (74) Kornilovsky IM. Clinical results after subepithelial photorefractive keratectomy (LASEK). *J Refract Surg* 2001 Mar-Apr;17(2 Suppl):S222-3.
- (75) Pallikaris IG, Papatzanaki ME, Stathi EZ, Frenschok O, Georgiadis A. Laser in situ keratomileusis. *Lasers Surg Med* 1990;10(5):463-468.
- (76) Kremer FB, Dufek M. Excimer laser in situ keratomileusis. *J Refract Surg* 1995 May-Jun;11(3 Suppl):S244-7.
- (77) Kakaria S, Hoang-Xuan T, Azar D. Microkeratomes. In: Azar D, Koch D, editors. *LASIK: fundamentals, surgical techniques, and complications* New York: Marcel Dekker; 2003. p. 57-70.

- (78) Krueger RR, Marchi V, Gualano A, Juhasz T, Speaker M, Suarez C. Clinical analysis of the neodymium:YLF picosecond laser as a microkeratome for laser in situ keratomileusis. Partially Sighted Eye Study. J Cataract Refract Surg 1998 Nov;24(11):1434-1440.
- (79) Soong HK, Malta JB. Femtosecond lasers in ophthalmology. Am J Ophthalmol 2009 Feb;147(2):189-197.e2.
- (80) Duplessie M. Surgical technique for laser-assisted in situ keratomileusis. Int Ophthalmol Clin 1996 Fall;36(4):45-51.
- (81) Nordan LT, Slade SG, Baker RN, Suarez C, Juhasz T, Kurtz R. Femtosecond laser flap creation for laser in situ keratomileusis: six-month follow-up of initial U.S. clinical series. J Refract Surg 2003 Jan-Feb;19(1):8-14.
- (82) Soong HK, Malta JB. Femtosecond lasers in ophthalmology. Am J Ophthalmol 2009 Feb;147(2):189-197.e2.
- (83) Lubatschowski H. Overview of commercially available femtosecond lasers in refractive surgery. J Refract Surg 2008 Jan;24(1):S102-7.
- (84) Ratkay-Traub I, Juhasz T, Horvath C, Suarez C, Kiss K, Ferincz I, Kurtz R. Ultra-short pulse (femtosecond) laser surgery: initial use in LASIK flap creation. Ophthalmol Clin North Am 2001 Jun;14(2):347-55, viii-ix.
- (85) Sugar A. Ultrafast (femtosecond) laser refractive surgery. Curr Opin Ophthalmol 2002 Aug;13(4):246-249.
- (86) Stonecipher K, Ignacio TS, Stonecipher M. Advances in refractive surgery: microkeratome and femtosecond laser flap creation in relation to safety, efficacy, predictability, and biomechanical stability. Curr Opin Ophthalmol 2006 Aug;17(4):368-372.
- (87) Kezirian GM, Stonecipher KG. Comparison of the IntraLase femtosecond laser and mechanical keratomes for laser in situ keratomileusis. J Cataract Refract Surg 2004 Apr;30(4):804-811.

- (88) Chung SH, Roh MI, Park MS, Kong YT, Lee HK, Kim EK. Mycobacterium abscessus keratitis after LASIK with IntraLase femtosecond laser. *Ophthalmologica* 2006;220(4):277-280.
- (89) Binder PS. Flap dimensions created with the IntraLase FS laser. *J Cataract Refract Surg* 2004 Jan;30(1):26-32.
- (90) Stonecipher KG, Dishler JG, Ignacio TS, Binder PS. Transient light sensitivity after femtosecond laser flap creation: clinical findings and management. *J Cataract Refract Surg* 2006 Jan;32(1):91-94.
- (91) Zhivov A, Stachs O, Stave J, Guthoff RF. In vivo three-dimensional confocal laser scanning microscopy of corneal surface and epithelium. *Br J Ophthalmol* 2009 May;93(5):667-672.
- (92) Kymionis GD, Kankariya VP, Plaka AD, Reinstein DZ. Femtosecond laser technology in corneal refractive surgery: a review. *J Refract Surg* 2012 Dec;28(12):912-920.
- (93) Lukosz W. Optical systems with resolving powers exceeding the classical limit. *J Opt Soc Am* 1966;57:11190.
- (94) Minsky M. Memoir on inventing the confocal scanning microscope. *Scanning J* 1988;10:128-138.
- (95) Petráň M, Hadravský M, Egger M, Galambos R. Tandem scanning reflected-light microscope. *J Opt Soc Am* 1968;58:661-664.
- (96) Egger M, Petráň M. New reflected-light microscope for viewing unstained brain and ganglion cells. *Science* 1967;157:305-307.
- (97) Boyde A. The tandem scanning reflected light microscope. Part 2. Pre-micro '84 applications at UCL. *Proc R Microsc Soc* 1985;20:130-139.
- (98) Petráň M, Hadravský M, Benes J, Boyde A. In vivo microscopy using the tandem scanning microscope. *Ann NY Acad Sci* 1986;483:440-447.

- (99) Lemp MA, Dilly PN, Boyde A. Tandem-scanning (confocal) microscopy of the full-thickness cornea. *Cornea* 1985 -1986;4(4):205-209.
- (100) McLaren JW, Nau CB, Kitzmann AS, Bourne WM. Keratocyte density: comparison of two confocal microscopes. *Eye Contact Lens* 2005 Jan;31(1):28-33.
- (101) Svishchev G. Microscope for the study of transparent lightscattering objects in incident light. *Opt Spectrosc* 1969;30:188-191.
- (102) Masters BR, Bohnke M. Confocal microscopy of the human cornea in vivo. *Int Ophthalmol* 2001;23(4-6):199-206.
- (103) Cavanagh HD, El-Agha MS, Petroll WM, Jester JV. Specular microscopy, confocal microscopy, and ultrasound biomicroscopy: diagnostic tools of the past quarter century. *Cornea* 2000 Sep;19(5):712-722.
- (104) Bohnke M, Masters BR. Confocal microscopy of the cornea. *Prog Retin Eye Res* 1999 Sep;18(5):553-628.
- (105) Masters BR, Thaer AA. Real-time scanning slit confocal microscopy of the in vivo human cornea. *Appl Opt* 1994 Feb 1;33(4):695-701.
- (106) Guthoff R, Baudouin C, Stave J. Atlas of confocal laser scanning in vivo microscopy in ophthalmology. Berlin: Heidelberg/Springer; 2006.
- (107) Masters B, Thaer A. In vivo real-time confocal microscopy of wing cells in the human cornea: a new benchmark for in vivo corneal microscopy. *Bioimages* 1995;3:7-11.
- (108) Mustonen RK, McDonald MB, Srivannaboon S, Tan AL, Doubrava MW, Kim CK. Normal human corneal cell populations evaluated by in vivo scanning slit confocal microscopy. *Cornea* 1998 Sep;17(5):485-492.
- (109) Popper M, Morgado AM, Quadrado MJ, Van Best JA. Corneal cell density measurement in vivo by scanning slit confocal microscopy: method and validation. *Ophthalmic Res* 2004 Sep-Oct;36(5):270-276.

- (110) Oliveira-Soto L, Efron N. Morphology of corneal nerves in soft contact lens wear. A comparative study using confocal microscopy. *Ophthalmic Physiol Opt* 2003 Mar;23(2):163-174.
- (111) Zhivov A, Stave J, Vollmar B, Guthoff R. In vivo confocal microscopic evaluation of Langerhans cell density and distribution in the normal human corneal epithelium. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2005 Oct;243(10):1056-1061.
- (112) Hollingsworth J, Perez-Gomez I, Mutalib HA, Efron N. A population study of the normal cornea using an in vivo, slit-scanning confocal microscope. *Optom Vis Sci* 2001 Oct;78(10):706-711.
- (113) Imre L, Nagymihaly A. Reliability and reproducibility of corneal endothelial image analysis by in vivo confocal microscopy. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2001 Jun;239(5):356-360.
- (114) Cavanagh HD, Petroll WM, Alizadeh H, He YG, McCulley JP, Jester JV. Clinical and diagnostic use of in vivo confocal microscopy in patients with corneal disease. *Ophthalmology* 1993 Oct;100(10):1444-1454.
- (115) Patel S, McLaren J, Hodge D, Bourne W. Normal human keratocyte density and corneal thickness measurement by using confocal microscopy in vivo. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001 Feb;42(2):333-339.
- (116) Erie JC, Patel SV, McLaren JW, Hodge DO, Bourne WM. Corneal keratocyte deficits after photorefractive keratectomy and laser in situ keratomileusis. *Am J Ophthalmol* 2006 May;141(5):799-809.
- (117) Tuisku IS, Konttinen YT, Konttinen LM, Tervo TM. Alterations in corneal sensitivity and nerve morphology in patients with primary Sjogren's syndrome. *Exp Eye Res* 2008 Jun;86(6):879-885.
- (118) Imayasu M, Petroll WM, Jester JV, Patel SK, Ohashi J, Cavanagh HD. The relation between contact lens oxygen transmissibility and binding of *Pseudomonas aeruginosa* to the cornea after overnight wear. *Ophthalmology* 1994 Feb;101(2):371-388.

- (119) Ren DH, Yamamoto K, Ladage PM, Molai M, Li L, Petroll WM, Jester JV, Cavanagh HD. Adaptive effects of 30-night wear of hyper-O(2) transmissible contact lenses on bacterial binding and corneal epithelium: a 1-year clinical trial. *Ophthalmology* 2002 Jan;109(1):27-39; discussion 39-40.
- (120) Cavanagh HD, Ladage PM, Li SL, Yamamoto K, Molai M, Ren DH, Petroll WM, Jester JV. Effects of daily and overnight wear of a novel hyper oxygen-transmissible soft contact lens on bacterial binding and corneal epithelium: a 13-month clinical trial. *Ophthalmology* 2002 Nov;109(11):1957-1969.
- (121) Ladage PM, Yamamoto K, Ren DH, Li L, Jester JV, Petroll WM, Jester JV. Effects of rigid and soft contact lens daily wear on corneal epithelium, tear lactate dehydrogenase, and bacterial binding to exfoliated epithelial cells. *Ophthalmology* 2001 Jul;108(7):1279-1288.
- (122) Richter A, Slowik C, Somodi S, Vick HP, Guthoff R. Corneal reinnervation following penetrating keratoplasty--correlation of esthesiometry and confocal microscopy. *Ger J Ophthalmol* 1996 Nov;5(6):513-517.
- (123) Niederer RL, Perumal D, Sherwin T, McGhee CN. Corneal innervation and cellular changes after corneal transplantation: an in vivo confocal microscopy study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2007 Feb;48(2):621-626.
- (124) Moller-Pedersen T, Vogel M, Li HF, Petroll WM, Cavanagh HD, Jester JV. Quantification of stromal thinning, epithelial thickness, and corneal haze after photorefractive keratectomy using in vivo confocal microscopy. *Ophthalmology* 1997 Mar;104(3):360-368.
- (125) Erie JC, Nau CB, McLaren JW, Hodge DO, Bourne WM. Long-term keratocyte deficits in the corneal stroma after LASIK. *Ophthalmology* 2004 Jul;111(7):1356-1361.
- (126) Pisella PJ, Auzeir O, Bokobza Y, Debbasch C, Baudouin C. Evaluation of corneal stromal changes in vivo after laser in situ keratomileusis with confocal microscopy. *Ophthalmology* 2001 Oct;108(10):1744-1750.

- (127) Vesaluoma M, Perez-Santonja J, Petroll WM, Linna T, Alio J, Tervo T. Corneal stromal changes induced by myopic LASIK. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000 Feb;41(2):369-376.
- (128) Perez-Gomez I, Efron N. Confocal microscopic evaluation of particles at the corneal flap interface after myopic laser in situ keratomileusis. *J Cataract Refract Surg* 2003 Jul;29(7):1373-1377.
- (129) Lee BH, McLaren JW, Erie JC, Hodge DO, Bourne WM. Reinnervation in the cornea after LASIK. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2002 Dec;43(12):3660-3664.
- (130) Darwish T, Brahma A, O'Donnell C, Efron N. Subbasal nerve fiber regeneration after LASIK and LASEK assessed by noncontact esthesiometry and in vivo confocal microscopy: prospective study. *J Cataract Refract Surg* 2007 Sep;33(9):1515-1521.
- (131) Erie JC, McLaren JW, Hodge DO, Bourne WM. Recovery of corneal subbasal nerve density after PRK and LASIK. *Am J Ophthalmol* 2005 Dec;140(6):1059-1064.
- (132) Bühren J, Kohnen T. Stromal haze after laser in situ keratomileusis: clinical and confocal microscopy findings. *J Cataract Refract Surg* 2003 Sep;29(9):1718-1726.
- (133) Erie JC, Patel SV, McLaren JW, Ramirez M, Hodge DO, Maguire LJ, Jester JV. Effect of myopic laser in situ keratomileusis on epithelial and stromal thickness: a confocal microscopy study. *Ophthalmology* 2002 Aug;109(8):1447-1452.
- (134) Avunduk AM, Senft CJ, Emerah S, Varnell ED, Kaufman HE. Corneal healing after uncomplicated LASIK and its relationship to refractive changes: a six-month prospective confocal study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004 May;45(5):1334-1339.
- (135) Patel SV, Maguire LJ, McLaren JW, Hodge DO, Bourne WM. Femtosecond laser versus mechanical microkeratome for LASIK: a randomized controlled study. *Ophthalmology* 2007 Aug;114(8):1482-1490.
- (136) Linna TU, Perez-Santonja JJ, Tervo KM, Sakla HF, Alio y Sanz JL, Tervo TM. Recovery of corneal nerve morphology following laser in situ keratomileusis. *Exp Eye Res* 1998 Jun;66(6):755-763.

- (137) Linna TU, Vesaluoma MH, Perez-Santonja JJ, Petroll WM, Alio JL, Tervo TM. Effect of myopic LASIK on corneal sensitivity and morphology of subbasal nerves. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000 Feb;41(2):393-397.
- (138) Dawson DG, Grossniklaus HE, McCarey BE, Edelhauser HF. Biomechanical and wound healing characteristics of corneas after excimer laser keratorefractive surgery: is there a difference between advanced surface ablation and sub-Bowman's keratomileusis? *J Refract Surg* 2008 Jan;24(1):S90-6.
- (139) Roberts C. Biomechanics of the cornea and wavefront-guided laser refractive surgery. *J Refract Surg* 2002 Sep-Oct;18(5):S589-92.
- (140) Bron AJ. The architecture of the corneal stroma. *Br J Ophthalmol* 2001 Apr;85(4):379-381.
- (141) Dupps WJ,Jr, Wilson SE. Biomechanics and wound healing in the cornea. *Exp Eye Res* 2006 Oct;83(4):709-720.
- (142) Dupps WJ,Jr. Biomechanical modeling of corneal ectasia. *J Refract Surg* 2005 Mar-Apr;21(2):186-190.
- (143) Dawson DG, Edelhauser HF, Grossniklaus HE. Long-term histopathologic findings in human corneal wounds after refractive surgical procedures. *Am J Ophthalmol* 2005 Jan;139(1):168-178.
- (144) Rajan MS, Watters W, Patmore A, Marshall J. In vitro human corneal model to investigate stromal epithelial interactions following refractive surgery. *J Cataract Refract Surg* 2005 Sep;31(9):1789-1801.
- (145) Moller-Pedersen T, Cavanagh HD, Petroll WM, Jester JV. Stromal wound healing explains refractive instability and haze development after photorefractive keratectomy: a 1-year confocal microscopic study. *Ophthalmology* 2000 Jul;107(7):1235-1245.
- (146) Moller-Pedersen T. Keratocyte reflectivity and corneal haze. *Exp Eye Res* 2004 Mar;78(3):553-560.

- (147) Zanini M, Savini G, Barboni P. Corneal melting associated with topical diclofenac use after laser-assisted subepithelial keratectomy. *J Cataract Refract Surg* 2006 Sep;32(9):1570-1572.
- (148) Gartry DS, Kerr Muir MG, Marshall J. Excimer laser photorefractive keratectomy. 18-month follow-up. *Ophthalmology* 1992 Aug;99(8):1209-1219.
- (149) Stephenson CG, Gartry DS, O'Brart DP, Kerr-Muir MG, Marshall J. Photorefractive keratectomy. A 6-year follow-up study. *Ophthalmology* 1998 Feb;105(2):273-281.
- (150) Lohmann CP, Gartry DS, Muir MK, Timberlake GT, Fitzke FW, Marshall J. Corneal haze after excimer laser refractive surgery: objective measurements and functional implications. *Eur J Ophthalmol* 1991 Oct-Dec;1(4):173-180.
- (151) Lohmann CP, Timberlake GT, Fitzke FW, Gartry DS, Muir MK, Marshall J. Corneal light scattering after excimer laser photorefractive keratectomy: the objective measurements of haze. *Refract Corneal Surg* 1992 Mar-Apr;8(2):114-121.
- (152) Teus MA, de Benito-Llopis L, Alio JL. Mitomycin C in corneal refractive surgery. *Surv Ophthalmol* 2009 Jul-Aug;54(4):487-502.
- (153) Rajan MS, Jaycock P, O'Brart D, Nystrom HH, Marshall J. A long-term study of photorefractive keratectomy; 12-year follow-up. *Ophthalmology* 2004 Oct;111(10):1813-1824.
- (154) Gabler B, Winkler von Mohrenfels C, Dreiss AK, Marshall J, Lohmann CP. Vitality of epithelial cells after alcohol exposure during laser-assisted subepithelial keratectomy flap preparation. *J Cataract Refract Surg* 2002 Oct;28(10):1841-1846.
- (155) Hazarbassanov R, Ben-Haim O, Varssano D, Grinbaum A, Kaiserman I. Alcohol- vs hypertonic saline-assisted laser-assisted subepithelial keratectomy. *Arch Ophthalmol* 2005 Feb;123(2):171-176.
- (156) Baldwin HC, Marshall J. Growth factors in corneal wound healing following refractive surgery: A review. *Acta Ophthalmol Scand* 2002 Jun;80(3):238-247.

- (157) Zieske JD, Guimaraes SR, Hutcheon AE. Kinetics of keratocyte proliferation in response to epithelial debridement. *Exp Eye Res* 2001 Jan;72(1):33-39.
- (158) Daniels JT, Khaw PT. Temporal stimulation of corneal fibroblast wound healing activity by differentiating epithelium in vitro. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2000 Nov;41(12):3754-3762.
- (159) Netto MV, Mohan RR, Ambrosio R, Jr, Hutcheon AE, Zieske JD, Wilson SE. Wound healing in the cornea: a review of refractive surgery complications and new prospects for therapy. *Cornea* 2005 Jul;24(5):509-522.
- (160) Jester JV, Ho-Chang J. Modulation of cultured corneal keratocyte phenotype by growth factors/cytokines control in vitro contractility and extracellular matrix contraction. *Exp Eye Res* 2003 Nov;77(5):581-592.
- (161) Garrett Q, Khaw PT, Blalock TD, Schultz GS, Grotendorst GR, Daniels JT. Involvement of CTGF in TGF-beta1-stimulation of myofibroblast differentiation and collagen matrix contraction in the presence of mechanical stress. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004 Apr;45(4):1109-1116.
- (162) Jester JV, Petroll WM, Cavanagh HD. Corneal stromal wound healing in refractive surgery: the role of myofibroblasts. *Prog Retin Eye Res* 1999 May;18(3):311-356.
- (163) Magallanes R, Shah S, Zadok D, Chayet AS, Assil KK, Montes M, Robledo N. Stability after laser in situ keratomileusis in moderately and extremely myopic eyes. *J Cataract Refract Surg* 2001 Jul;27(7):1007-1012.
- (164) Pallikaris IG, Kymionis GD, Astyrakakis NI. Corneal ectasia induced by laser in situ keratomileusis. *J Cataract Refract Surg* 2001 Nov;27(11):1796-1802.
- (165) Rad AS, Jabbarvand M, Saifi N. Progressive keratectasia after laser in situ keratomileusis. *J Refract Surg* 2004 Sep-Oct;20(5 Suppl):S718-22.
- (166) Randleman JB, Trattler WB, Stulting RD. Validation of the Ectasia Risk Score System for preoperative laser in situ keratomileusis screening. *Am J Ophthalmol* 2008 May;145(5):813-818.

- (167) Netto MV, Mohan RR, Medeiros FW, Dupps WJ,Jr, Sinha S, Krueger RR, Stapleton WM, Rayborn M, Suto C, Wilson SE. Femtosecond laser and microkeratome corneal flaps: comparison of stromal wound healing and inflammation. *J Refract Surg* 2007 Sep;23(7):667-676.
- (168) Durrie DS, Kezirian GM. Femtosecond laser versus mechanical keratome flaps in wavefront-guided laser in situ keratomileusis: prospective contralateral eye study. *J Cataract Refract Surg* 2005 Jan;31(1):120-126.
- (169) Mohan RR, Hutcheon AE, Choi R, Hong J, Lee J, Mohan RR, Ambrósio R Jr, Zieske JD, Wilson SE. Apoptosis, necrosis, proliferation, and myofibroblast generation in the stroma following LASIK and PRK. *Exp Eye Res* 2003 Jan;76(1):71-87.
- (170) Wilson SE, He YG, Weng J, Li Q, McDowall AW, Vital M, Chwang EL. Epithelial injury induces keratocyte apoptosis: hypothesized role for the interleukin-1 system in the modulation of corneal tissue organization and wound healing. *Exp Eye Res* 1996 Apr;62(4):325-327.
- (171) de Medeiros FW, Kaur H, Agrawal V, Chaurasia SS, Hammel J, Dupps WJ,Jr, Wilson SE. Effect of femtosecond laser energy level on corneal stromal cell death and inflammation. *J Refract Surg* 2009 Oct;25(10):869-874.
- (172) Hong JW, Liu JJ, Lee JS, Mohan RR, Mohan RR, Woods DJ, He YG, Wilson SE. Proinflammatory chemokine induction in keratocytes and inflammatory cell infiltration into the cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2001 Nov;42(12):2795-2803.
- (173) Helena MC, Baerveldt F, Kim WJ, Wilson SE. Keratocyte apoptosis after corneal surgery. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1998 Feb;39(2):276-283.
- (174) Kim JY, Kim MJ, Kim TI, Choi HJ, Pak JH, Tchah H. A femtosecond laser creates a stronger flap than a mechanical microkeratome. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006 Feb;47(2):599-604.
- (175) Wilson SE, Mohan RR, Mohan RR, Ambrosio R,Jr, Hong J, Lee J. The corneal wound healing response: cytokine-mediated interaction of the epithelium, stroma, and inflammatory cells. *Prog Retin Eye Res* 2001 Sep;20(5):625-637.

- (176) Wilson SE, Liu JJ, Mohan RR. Stromal-epithelial interactions in the cornea. *Prog Retin Eye Res* 1999 May;18(3):293-309.
- (177) Vinciguerra P, Torres I, Camesasca FI. Applications of confocal microscopy in refractive surgery. *J Refract Surg* 2002 May-Jun;18(3 Suppl):S378-81.
- (178) Perez-Gomez I, Efron N. Change to corneal morphology after refractive surgery (myopic laser in situ keratomileusis) as viewed with a confocal microscope. *Optom Vis Sci* 2003 Oct;80(10):690-697.
- (179) Perez-Gomez I, Efron N. Confocal microscopic evaluation of particles at the corneal flap interface after myopic laser in situ keratomileusis. *J Cataract Refract Surg* 2003 Jul;29(7):1373-1377.
- (180) Avunduk AM, Senft CJ, Emerah S, Varnell ED, Kaufman HE. Corneal healing after uncomplicated LASIK and its relationship to refractive changes: a six-month prospective confocal study. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2004 May;45(5):1334-1339.
- (181) Gokmen F, Jester JV, Petroll WM, McCulley JP, Cavanagh HD. In vivo confocal microscopy through-focusing to measure corneal flap thickness after laser in situ keratomileusis. *J Cataract Refract Surg* 2002 Jun;28(6):962-970.
- (182) Ivarsen A, Laurberg T, Moller-Pedersen T. Characterisation of corneal fibrotic wound repair at the LASIK flap margin. *Br J Ophthalmol* 2003 Oct;87(10):1272-1278.
- (183) Tervo T, Moilanen J. In vivo confocal microscopy for evaluation of wound healing following corneal refractive surgery. *Prog Retin Eye Res* 2003 May;22(3):339-358.
- (184) Ivarsen A, Thogersen J, Keiding SR, Hjortdal JO, Moller-Pedersen T. Plastic particles at the LASIK interface. *Ophthalmology* 2004 Jan;111(1):18-23.
- (185) Morishige N, Kesler-Diaz A, Wahlert AJ, Kurtz RM, Juhasz T, Sarayba M, Jester JV. Corneal response to femtosecond laser photodisruption in the rabbit. *Exp Eye Res* 2008 May;86(5):835-843.

- (186) Sonigo B, Iordanidou V, Chong-Sit D, Auclin F, Ancel JM, Labbe A, Baudouin C. In vivo corneal confocal microscopy comparison of intralase femtosecond laser and mechanical microkeratome for laser in situ keratomileusis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2006 Jul;47(7):2803-2811.
- (187) Ramirez M, Hernandez-Quintela E, Naranjo-Tackman R. A comparative confocal microscopy analysis after LASIK with the IntraLase femtosecond laser vs Hansatome microkeratome. *J Refract Surg* 2007 Mar;23(3):305-307.
- (188) Petroll WM, Bowman RW, Cavanagh HD, Verity SM, Mootha VV, McCulley JP. Assessment of keratocyte activation following LASIK with flap creation using the IntraLase FS60 laser. *J Refract Surg* 2008 Oct;24(8):847-849.
- (189) Kitzmann AS, Bourne WM, Patel SV. Confocal microscopy of a femtosecond laser LASIK flap before separation. *Am J Ophthalmol* 2007 Apr;143(4):691-693.
- (190) Dawson DG, Holley GP, Geroski DH, Waring GO, 3rd, Grossniklaus HE, Edelhauser HF. Ex vivo confocal microscopy of human LASIK corneas with histologic and ultrastructural correlation. *Ophthalmology* 2005 Apr;112(4):634-644.
- (191) Noh HK, Lee SW, Kim JM, Oh JE, Kim KH, Chung CP, Choi SC, Park WH, Min BM. Electrospinning of chitin nanofibers: degradation behavior and cellular response to normal human keratinocytes and fibroblasts. *Biomaterials* 2006 Jul;27(21):3934-3944.
- (192) Barbosa FL, Chaurasia SS, Cutler A, Asosingh K, Kaur H, de Medeiros FW, Agrawal V, Wilson SE. Corneal myofibroblast generation from bone marrow-derived cells. *Exp Eye Res* 2010 Jul;91(1):92-96.
- (193) Rocha KM, Kagan R, Smith SD, Krueger RR. Thresholds for interface haze formation after thin-flap femtosecond laser in situ keratomileusis for myopia. *Am J Ophthalmol* 2009 Jun;147(6):966-72, 972.e1.
- (194) Kermani O, Oberheide U. Comparative micromorphologic in vitro porcine study of IntraLase and Femto LDV femtosecond lasers. *J Cataract Refract Surg* 2008 Aug;34(8):1393-1399.

- (195) Cummings J, Spanswick VJ, Tomasz M, Smyth JF. Enzymology of mitomycin C metabolic activation in tumour tissue: implications for enzyme-directed bioreductive drug development. *Biochem Pharmacol* 1998 Aug 15;56(4):405-414.
- (196) Bligh HF, Bartoszek A, Robson CN, Hickson ID, Kasper CB, Beggs JD, Wolf CR. Activation of mitomycin C by NADPH:cytochrome P-450 reductase. *Cancer Res* 1990 Dec 15;50(24):7789-7792.
- (197) Singh G, Wilson MR, Foster CS. Mitomycin eye drops as treatment for pterygium. *Ophthalmology* 1988 Jun;95(6):813-821.
- (198) Rubinfeld RS, Pfister RR, Stein RM, Foster CS, Martin NF, Stoleru S, Talley AR, Speaker MG. Serious complications of topical mitomycin-C after pterygium surgery. *Ophthalmology* 1992 Nov;99(11):1647-1654.
- (199) Fujitani A, Hayasaka S, Shibuya Y, Noda S. Corneoscleral ulceration and corneal perforation after pterygium excision and topical mitomycin C therapy. *Ophthalmologica* 1993;207(3):162-164.
- (200) Cano-Parra J, Diaz-Llopis M, Maldonado MJ, Vila E, Menezo JL. Prospective trial of intraoperative mitomycin C in the treatment of primary pterygium. *Br J Ophthalmol* 1995 May;79(5):439-441.
- (201) Lam DS, Wong AK, Fan DS, Chew S, Kwok PS, Tso MO. Intraoperative mitomycin C to prevent recurrence of pterygium after excision: a 30-month follow-up study. *Ophthalmology* 1998 May;105(5):901-4; discussion 904-5.
- (202) Palmer SS. Mitomycin as adjunct chemotherapy with trabeculectomy. *Ophthalmology* 1991 Mar;98(3):317-321.
- (203) Fontana H, Nouri-Mahdavi K, Caprioli J. Trabeculectomy with mitomycin C in pseudophakic patients with open-angle glaucoma: outcomes and risk factors for failure. *Am J Ophthalmol* 2006 Apr;141(4):652-659.
- (204) Watanabe J, Sawaguchi S, Fukuchi T, Abe H, Zhou L. Effects of mitomycin C on the expression of proliferating cell nuclear antigen after filtering surgery in rabbits. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 1997 Apr;235(4):234-240.

- (205) Khaw PT, Doyle JW, Sherwood MB, Grierson I, Schultz G, McGorray S. Prolonged localized tissue effects from 5-minute exposures to fluorouracil and mitomycin C. *Arch Ophthalmol* 1993 Feb;111(2):263-267.
- (206) Rubinfeld RS, Stein RM. Topical mitomycin-C for pterygia: is single application appropriate? *Ophthalmic Surg Lasers* 1997 Aug;28(8):662-669.
- (207) Avisar R, Weinberger D. Pterygium surgery with mitomycin C: how much sclera should be left bare? *Cornea* 2003 Nov;22(8):721-725.
- (208) Frucht-Pery J, Sugar J, Baum J, Sutphin JE, Pe'er J, Savir H, Holland EJ, Meisler DM, Foster JA, Folberg R, Rozenman Y. Mitomycin C treatment for conjunctival-corneal intraepithelial neoplasia: a multicenter experience. *Ophthalmology* 1997 Dec;104(12):2085-2093.
- (209) Wilson MW, Hungerford JL, George SM, Madreperla SA. Topical mitomycin C for the treatment of conjunctival and corneal epithelial dysplasia and neoplasia. *Am J Ophthalmol* 1997 Sep;124(3):303-311.
- (210) Daniell M, Maini R, Tole D. Use of mitomycin C in the treatment of corneal conjunctival intraepithelial neoplasia. *Clin Experiment Ophthalmol* 2002 Apr;30(2):94-98.
- (211) Chalasani R, Giblin M, Conway RM. Role of topical chemotherapy for primary acquired melanosis and malignant melanoma of the conjunctiva and cornea: review of the evidence and recommendations for treatment. *Clin Experiment Ophthalmol* 2006 Sep-Oct;34(7):708-714.
- (212) Talamo JH, Gollamudi S, Green WR, De La Cruz Z, Filatov V, Stark WJ. Modulation of corneal wound healing after excimer laser keratomileusis using topical mitomycin C and steroids. *Arch Ophthalmol* 1991 Aug;109(8):1141-1146.
- (213) Song JS, Kim JH, Yang M, Sul D, Kim HM. Mitomycin-C concentration in cornea and aqueous humor and apoptosis in the stroma after topical mitomycin-C application: effects of mitomycin-C application time and concentration. *Cornea* 2007 May;26(4):461-467.

- (214) Kim TI, Tchah H, Lee SA, Sung K, Cho BJ, Kook MS. Apoptosis in keratocytes caused by mitomycin C. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2003 May;44(5):1912-1917.
- (215) Rajan MS, O'Brart DP, Patmore A, Marshall J. Cellular effects of mitomycin-C on human corneas after photorefractive keratectomy. *J Cataract Refract Surg* 2006 Oct;32(10):1741-1747.
- (216) Netto MV, Chalita MR, Krueger RR. Corneal haze following PRK with mitomycin C as a retreatment versus prophylactic use in the contralateral eye. *J Refract Surg* 2007 Jan;23(1):96-98.
- (217) Maldonado MJ. Intraoperative MMC after excimer laser surgery for myopia. *Ophthalmology* 2002 May;109(5):826; author reply 826-8.
- (218) Chang SW. Corneal keratocyte apoptosis following topical intraoperative mitomycin C in rabbits. *J Refract Surg* 2005 Sep-Oct;21(5):446-453.
- (219) Moller-Pedersen T. Keratocyte reflectivity and corneal haze. *Exp Eye Res* 2004 Mar;78(3):553-560.
- (220) Wilson SE, Mohan RR, Hutcheon AE, Mohan RR, Ambrosio R, Zieske JD, Hong J, Lee J. Effect of ectopic epithelial tissue within the stroma on keratocyte apoptosis, mitosis, and myofibroblast transformation. *Exp Eye Res* 2003 Feb;76(2):193-201.
- (221) Herrmann WA, Muecke M, Koller M, Gabel VP, Lohmann CP. Keratocyte density in the retroablation area after LASEK for the correction of myopia. *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol* 2007 Mar;245(3):426-430.
- (222) Erie JC, Patel SV, McLaren JW, Hodge DO, Bourne WM. Keratocyte density in the human cornea after photorefractive keratectomy. *Arch Ophthalmol* 2003 Jun;121(6):770-776.
- (223) Frueh BE, Cadez R, Bohnke M. In vivo confocal microscopy after photorefractive keratectomy in humans. A prospective, long-term study. *Arch Ophthalmol* 1998 Nov;116(11):1425-1431.

- (224) Gambato C, Ghirlando A, Moretto E, Busato F, Midena E. Mitomycin C modulation of corneal wound healing after photorefractive keratectomy in highly myopic eyes. *Ophthalmology* 2005 Feb;112(2):208-18; discussion 219.
- (225) de Benito-Llopis L, Canadas P, Drake P, Hernandez-Verdejo JL, Teus MA. Keratocyte density 3 months, 15 months, and 3 years after corneal surface ablation with mitomycin C. *Am J Ophthalmol* 2012 Jan;153(1):17-23.e1.
- (226) Mitooka K, Ramirez M, Maguire LJ, Erie JC, Patel SV, McLaren JW, Hodge DO, Bourne WM. Keratocyte density of central human cornea after laser in situ keratomileusis. *Am J Ophthalmol* 2002 Mar;133(3):307-314.
- (227) Ortiz D, Alio JL, Pinero D. Measurement of corneal curvature change after mechanical laser in situ keratomileusis flap creation and femtosecond laser flap creation. *J Cataract Refract Surg* 2008 Feb;34(2):238-242.
- (228) Gil-Cazorla R, Teus MA, de Benito-Llopis L, Mikropoulos DG. Femtosecond laser vs mechanical microkeratome for hyperopic laser in situ keratomileusis. *Am J Ophthalmol* 2011 Jul;152(1):16-21.e2.
- (229) Zhang F, Deng S, Guo N, Wang M, Sun X. Confocal Comparison of Corneal Nerve Regeneration and Keratocyte Reaction between FS-LASIK, OUP-SBK, and Conventional LASIK. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2012 Aug 15;53(9):5536-5544.
- (230) Angunawela RI, Poh R, Chaurasia SS, Tan DT, Mehta JS. A mouse model of lamellar intrastromal femtosecond laser keratotomy: ultra-structural, inflammatory, and wound healing responses. *Mol Vis* 2011;17:3005-3012.
- (231) Santhiago MR, Wilson SE. Cellular effects after laser in situ keratomileusis flap formation with femtosecond lasers: a review. *Cornea* 2012 Feb;31(2):198-205.
- (232) Twa MD, Giese MJ. Assessment of corneal thickness and keratocyte density in a rabbit model of laser in situ keratomileusis using scanning laser confocal microscopy. *Am J Ophthalmol* 2011 Dec;152(6):941-953.e1.
- (233) Ali Javadi M, Kanavi MR, Mahdavi M, Yaseri M, Rabiei HM, Javadi A, Sajjadi SH. Comparison of keratocyte density between keratoconus, post-laser in situ

keratomileusis keratectasia, and uncomplicated post-laser in situ keratomileusis cases. A confocal scan study. *Cornea* 2009 Aug;28(7):774-779.

(234) McLaren JW, Patel SV, Nau CB, Bourne WM. Automated assessment of keratocyte density in clinical confocal microscopy of the corneal stroma. *J Microsc* 2008 Jan;229(Pt 1):21-31.

(235) McLaren JW, Bourne WM, Patel SV. Automated assessment of keratocyte density in stromal images from the ConfoScan 4 confocal microscope. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2010 Apr;51(4):1918-1926.

(236) Gil-Cazorla R, Teus MA, de Benito-Llopis L, Fuentes I. Incidence of diffuse lamellar keratitis associated with IntraLase 15 kHz femtosecond laser and Moria M2 microkeratome after laser in situ keratomileusis. *J Cataract Refract Surg* 2008;34(1):28-31.

(237) Berlau J, Becker HH, Stave J, Oriwol C, Guthoff RF. Depth and age-dependent distribution of keratocytes in healthy human corneas: a study using scanning-slit confocal microscopy in vivo. *J Cataract Refract Surg*. 2002 Apr;28(4):611-6.

(238) Müller LJ, Pels L, Vrensen GF. Novel aspects of the ultrastructural organization of human corneal keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 1995 Dec;36(13):2557-67